

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología Animal II



TESIS DOCTORAL

Diferencias individuales en las capacidades de aprendizaje y memoria, y en la vulnerabilidad al deterioro cognitivo inducido por estrés en la rata : relación con los niveles de ansiedad y prevención con un péptido sintético mimético de la molécula de adhesión celular neural

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Érika Borcel Novoa

DIRECTOR:

Cesar Venero Nuñez

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5324994940

T57.175.8
BOR
dip

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Fisiología Animal II



Diferencias individuales en las capacidades de aprendizaje y memoria, y en la vulnerabilidad al deterioro cognitivo inducido por estrés en la rata: Relación con los niveles de ansiedad y prevención con un péptido sintético mimético de la molécula de adhesión celular neural



TESIS DOCTORAL

R137056542

Erika Myrna Borcel Novoa

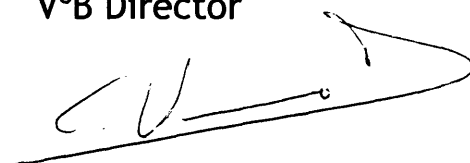
2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA
Departamento de Fisiología Animal II

Diferencias individuales en las capacidades de aprendizaje y memoria, y en la vulnerabilidad al deterioro cognitivo inducido por estrés en la rata: Relación con los niveles de ansiedad y prevención con un péptido sintético mimético de la molécula de adhesión celular neural

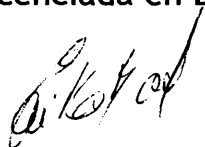
VºB Director



Dr. César Venero Núñez

TESIS DOCTORAL

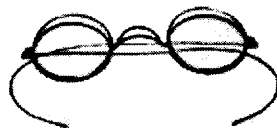
Erika Myrna Borcel Novoa
Licenciada en Biología



Madrid, 2008

Las personas mayores nunca comprenden por si solas las cosas, y resulta muy fastidioso para los niños, tener que darles continuamente explicaciones

Antoine de Saint-Exupéry



Abreviaturas

- 5-HT → serotonina, 5-hidroxi triptamina
- A → adrenalina
- ACTH → hormona adenocorticotropa, del inglés *adrenocorticotropin hormone*
- ADN → ácido desoxirribonucleico
- ADX → adrenalectomía
- ARNm → ácido ribonucleico mensajero
- AVP → arginina vasopresina
- AP → área alrededor de la plataforma en el laberinto acuático
- BDNF → factor neurotrófico derivado de cerebro, del inglés *brain derived neurotrophic factor*
- BDNFR → receptor para el factor neurotrófico derivado de cerebro, del inglés *brain derived neurotrophic factor receptor*
- BrdU → bromodeoxiuridina
- CA → campo abierto
- CAM → molécula de adhesión celular, del inglés *cellular adhesion molecule*
- CHD → dominio homólogo con CAM, del inglés *CAM-homology domain*
- CLO → caja luz-oscuridad
- CMC → condicionamiento del miedo al contexto
- CMT → condicionamiento del miedo al tono
- CPF → corteza prefrontal
- CPFm → corteza prefrontal medial
- CRF/CRH → factor/ hormona liberadora de corticotropina, del inglés *corticotropine release factor/hormone*
- DA → dopamina
- DAB → diaminobencidina
- DAG → diacil glicerol
- dB → decibelio
- DBD → sitio de unión para el ADN, del inglés *DNA-binding*
- EA → enfermedad de Alzheimer
- EC → estímulo condicionado
- ECI → estrés crónico impredecible
- EI → estímulo incondicionado
- FAK → kinasas de adhesión focal, del inglés *focal adhesion kinases*
- FGF → factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *fibroblast growth factor*
- FGFR → receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *fibroblast growth factor receptor*
- FGL → módulo de unión de NCAM al receptor de FGF, del inglés *FG loop*
- FnIII → fibronectina III
- GABA → ácido γ -amino butírico
- GD → giro dentado del hipocampo
- GDNFR → receptor para el factor neurotrófico derivado de células gliales, del inglés *glial cell derived neurotrophic factor receptor*
- GH → hormona de crecimiento, del inglés *growth hormone*
- GPI → glicosil fosfatidil inositol
- GR → receptor de glucocorticoides, del inglés *glucocorticoid receptor*
- GREs → elemento de respuesta a glucocorticoides, del inglés *glucocorticoid response elements*
- HA → animal de elevada ansiedad, del inglés *high anxiety*
- HHA → hipotálamo hipófisis adrenal
- HR → humedad relativa
- Hsp90 → proteína termosensible 90, del inglés *heat shock protein 90*
- Hz → herzio
- I.A. → índice de alternancia

- IA → animal de ansiedad intermedia, del inglés *intermedium anxiety*
- I.c.v. → intracerebroventricular
- ID → índice de discriminación
- Ig → inmunoglobulina
- IL → inhibición latente
- IP3 → inositol 1,4,5-trifosfato, del inglés *inositol 1,4,5-triphosphate*
- IRS → inhibidores de la recaptura de serotonina
- LA → animal de baja ansiedad, del inglés *low anxiety*
- LAM → laberinto acuático de Morris
- LC → *locus coeruleus*
- LCE → laberinto en cruz elevado
- LDB → sitio de unión para el ligando, del inglés, *ligand-binding*
- LTD → depresión de larga duración, del inglés *long term depression*
- LTP → potenciación de larga duración, del inglés *long term potentiation*
- mA → miliamperios
- MAPK → proteínas kinasas activadoras de mitógenos, del inglés *mitogen-activated protein kinases*
- m-CPP → meta-clorofenilpiperazina
- MR → receptor de mineralocorticoides, del inglés *mineralocorticoid receptor*
- NA → noradrenalina
- NBLA → núcleo basolateral de la amígdala
- NCAM → molécula de adhesión celular neural, del inglés *neural cellular adhesion molecule*
- NCeA → núcleo central de la amígdala
- NGF → factor de crecimiento neuronal, del inglés *neural growth factor*
- NLA → núcleo lateral de la amígdala
- NLET → núcleo del lecho de la estria terminal
- NPV → núcleo paraventricular
- NTS → núcleo del tracto solitario
- OPD → ortofenilendiaminafosfato
- PAE → prueba de alternancia espontánea
- PBS → tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffer saline*
- PBST → tampón fosfato salino con Tween, del inglés *phosphate buffer saline tween*
- PC → fosfolipasa C, del inglés *phospholipase C*
- PKC → proteína kinasa C
- PLO → prueba de localización de objetos
- POMC → proopiomelanocortina
- PRO → prueba de reconocimiento de objetos
- PSA → α 2,8-ácido polisiálico, del inglés *α 2,8-poly-sialic acid*
- Q1, Q2, Q3, Q4 → cuadrantes en los que se divide virtualmente la piscina del laberinto acuático, del inglés *quadrant*
- RIA → radioinmunoensayo, del inglés *radio immuno assay*
- RMf → resonancia magnética funcionañ
- SGPA → sustancia gris periacueductal
- SNA → sistema nervioso autónomo
- SNA → sistema noradrenérgico
- SNC → sistema nervioso central
- TEP → tomografía por emisión de positrones
- TH → tirosina hidroxilasa
- VIP → péptido intestinal vasoactivo, del inglés *vasoactive intestinal peptide*
- ZP → zona periférica de la piscina

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	13
1. Neurobiología de la ansiedad	15
1.1. Neuroquímica de la ansiedad	17
1.1.1. Sistema Noradrenérgico	18
1.1.2. Sistema Serotoninérgico	20
1.1.3. Sistema GABAérgico	22
1.1.4. Sistema CRF	24
1.2. Neuroanatomía de la ansiedad	26
2. La respuesta fisiológica de estrés	33
2.1. Sistema nervioso autónomo	35
2.2. Eje hipotálamo-hipófisis adrenal	37
2.3. Receptores para glucocorticoides	40
2.3.1. Distribución cerebral	41
2.3.2. Acciones	43
3. Moléculas de adhesión celular neural	46
3.1. Estructura molecular de NCAM	46
3.2. Funciones de NCAM	49
3.3. Mecanismos de señalización de NCAM	50
3.4. FGL, un péptido mimético de NCAM	51
4. Aprendizaje y memoria	53
4.1. Plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria	56
4.2. Implicación de la adrenalina en el aprendizaje y la memoria	58
4.3. Implicación de los glucocorticoides en el aprendizaje y la memoria	60
4.4. Implicación de NCAM en el aprendizaje y la memoria	64
4.5. Pruebas de aprendizaje	67
4.5.1. Laberinto acuático de Morris	67
4.5.2. Condicionamiento del miedo	68
4.5.3. Prueba de reconocimiento de objetos	70
4.5.4. Prueba de localización de objetos	71
4.5.5. Prueba de alternancia espontánea	71
5. Envejecimiento	72

II. OBJETIVOS	75
III. MATERIAL Y MÉTODOS	81
1. Animales de experimentación	83
2. Pruebas conductuales y cognitivas	83
2.1. Laberinto en cruz elevado	83
2.2. Campo abierto	85
2.3. Caja luz-oscuridad	86
2.4. Laberinto acuático de Morris	88
2.5. Condicionamiento del miedo	90
2.5.1. Condicionamiento del miedo al contexto	92
2.5.2. Condicionamiento del miedo al tono	92
2.5.3. Prueba de inhibición latente	93
2.6. Prueba de reconocimiento de objetos	94
2.7. Prueba de localización de objetos	96
2.8. Prueba de alternancia espontánea	97
3. Estrés crónico e impredecible	99
4. Adrenalectomía	100
5. Tratamientos farmacológicos	101
6. Técnicas bioquímicas	102
6.1. Determinación de la corticosterona plasmática mediante la técnica de RIA	102
6.2. Determinación de los niveles de glucosa en sangre	103
6.3. Cuantificación de los niveles de receptores de glucocorticoides, NCAMs, receptor de FGF y FGF en el hipocampo y en la corteza prefrontal de rata	103
6.3.1. Obtención de homogenados y sinaptosomas	103
6.3.2. Valoración de proteínas	104
6.3.3. Técnica de ELISA	105
6.4. Estudio de la supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo de rata	107
6.4.1. Protocolo de marcaje con BrdU para secciones obtenidas con vibratomo	107
6.4.2. Marcaje y cuantificación de células BrdU positivas	108
6.4.3. Cuantificación de células granulares mediante estereología	108
6.5. Estimación del volumen del hipocampo y del giro dentado de rata	109

6.6. Cuantificación de espinas dendríticas en el área CA1 del giro dentado de hipocampo	109
6.6.1. Inyecciones con amarillo Lucifer	109
6.6.2. Procesamiento del tejido	109
6.6.3. Cuantificación de la densidad de espinas	110
7. Análisis estadísticos	111
8. Diseño experimental	111
Caracterización del modelo de ansiedad y estudio de la vulnerabilidad al daño inducido por el estrés crónico y/o asociado al envejecimiento	111
8.1. Caracterización del modelo de ansiedad	112
8.1.1. Características bioquímicas	113
8.1.2. Características conductuales y cognitivas	113
8.2. Efecto del rasgo de ansiedad en la vulnerabilidad al estrés y al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento	116
8.2.1. Características bioquímicas	117
8.2.2. Características conductuales y cognitivas	117
Estudio del efecto del FGL sobre el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica. Posible papel neuroprotector frente al daño inducido por el estrés crónico	121
8.3. Efecto del FGL en el aprendizaje y la memoria espacial	121
8.4. Efecto de la administración de FGL sobre el número de espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo	121
8.5. El FGL previene el daño cognitivo provocado por estrés y asociado al envejecimiento.....	122
IV. RESULTADOS	125
1. Caracterización del modelo de ansiedad y estudio de la vulnerabilidad al daño inducido por el estrés crónico y/o asociado al envejecimiento	127
1.1. Caracterización del modelo de ansiedad	127
1.1.1. Características bioquímicas	127
1.1.2. Evaluación conductual y cognitiva	132
1.2. Efecto del rasgo de ansiedad en la vulnerabilidad al estrés y al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento	147
1.2.1. Efecto del ECI en la ganancia de peso	147
1.2.2. Evaluación conductual y cognitiva	147
1.2.3. Características bioquímicas	154

2. Estudio del efecto del FGL sobre el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica. Posible papel neuroprotector frente al daño inducido por el estrés crónico	166
2.1. Efecto del FGL en el aprendizaje y la memoria espacial.....	166
2.2. Efecto de la administración de FGL sobre el número de espinas dendríticas	168
2.3. El FGL previene el daño cognitivo	168
2.3.1. Efecto del ECI en la ganancia de peso	168
2.3.2. Efecto protector del FGL en el aprendizaje y la memoria espacial	169
2.3.3. Efecto protector del FGL en el cerebro	171
 V. DISCUSIÓN	175
1. Caracterización del modelo de ansiedad y estudio de la vulnerabilidad al daño inducido por el estrés crónico y/o asociado al envejecimiento	177
1.1. Caracterización del modelo de ansiedad	177
1.2. Efecto del rasgo de ansiedad en la vulnerabilidad al estrés y al déficit cognitivo asociado al envejecimiento	194
2. Estudio del efecto del FGL sobre el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica. Posible papel neuroprotector frente al daño inducido por el estrés crónico	221
2.1. Efecto del FGL en el aprendizaje y memoria espacial	221
2.2. Efecto de la administración de FGL sobre el número de espinas dendríticas	221
2.3. El FGL previene el daño cognitivo	224
 VI. CONCLUSIONES	233
 VII. BIBLIOGRAFÍA	237

I. Introducción

1. Neurobiología de la ansiedad

Día tras día, tanto los humanos como el resto de los animales deben enfrentarse a continuos desafíos. En la mayoría de los casos se trata de situaciones ansiogénicas, como pueden ser el realizar un examen, una entrevista de trabajo o hablar en público para los primeros, y buscar comida, enfrentarse con posibles depredadores o mantener el nivel jerárquico dentro del grupo social en el caso de los segundos. Incluso en ocasiones, es el propio entorno o contexto el que puede resultar ansiogénico, como un lugar desconocido o los espacios elevados. Mientras que algunos individuos sienten la necesidad de superar dichos desafíos y vencer así su miedo y su ansiedad, otros prefieren evitarlo o escapar (Ennaceur y cols, 2006). Así, en dichas situaciones los individuos adoptan diferentes estrategias, como puede ser enfrentarse y luchar (lo que se define como una respuesta o individuo 'proactivo') o bien optar por una actitud pasiva y/o retirarse (respuesta o individuo 'reactivo') (Ennaceur y cols, 2006;Overli, 2007). Factores genéticos y epigenéticos se combinan para dar lugar a rasgos relativamente estables que confieren diferentes capacidades de adaptación al entorno (Dingemanse y cols, 2004;Griffiths y cols, 2004;Overli, 2007).

En lo referente al estudio de la personalidad humana, la ansiedad ha sido incluida como un rasgo importante a tener en cuenta tanto desde un punto de vista teórico como experimental (Siegler y cols, 1990), siendo caracterizada dentro de una dimensión continua que va desde lo adaptativo hasta lo maladaptativo (Plomin y cols, 1994). A su vez, el estado emocional en el que se encuentran los sujetos puede ser crucial en la ejecución de pruebas de aprendizaje y memoria (McNaughton y cols, 1997;Ribeiro y cols, 1999;Hariri y cols, 2003;de Quervain y cols, 2003a). De hecho, aunque determinadas experiencias pueden modificar el estado en el que se encuentra un animal durante periodos de tiempo prolongados, no siempre alteran el rasgo característico de dicho animal.

Mientras que unos niveles moderados de ansiedad se corresponden con respuestas adaptativas ante estresores psicosociales o fisiológicos, niveles de ansiedad excesivos o muy prolongados en el tiempo provocan angustia y sufrimiento, que en los casos más severos pueden llegar a manifestarse en forma de desórdenes de ansiedad

diagnosticables a nivel clínico, siendo hoy en día, el desorden psiquiátrico más común (Maier y cols, 2000;Finn y cols, 2003).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la ansiedad y el miedo son reacciones distintas. El **miedo** es la reacción aguda ante la presencia explícita de un estímulo nocivo e implica una estrategia de defensa simple o bien una evitación activa de la situación, controlada por un sistema de lucha, de huida o de inmovilización. En muchos casos, el miedo va acompañado por cierta tendencia a aproximarse a la fuente de la amenaza, produciéndose un conflicto interno aproximación – evitación (McNaughton, 2006). Por otro lado, la **ansiedad** se corresponde más con un estado de alerta generalizado e inespecífico, por lo que afrontar dicha situación suele ser más complicado. La diferencia entre ambas reacciones psicofisiológicas se refleja a su vez en que poseen correlatos anatómicos y moleculares diferentes, pero en parte superpuestos (LeDoux, 2000;Cannistraro y Rauch, 2003).

Son varios los mecanismos psicobiológicos que subyacen a la ansiedad y están implicados por tanto en su etiología, modulación y tratamiento (Griebel y cols, 1999a;Griebel y cols, 1999b;Lesch, 2001;Blanchard y cols, 2001a;Blanchard y cols, 2001b;Kent y cols, 2002;Hood y cols, 2006). Las evidencias obtenidas sobre dichos mecanismos proceden tanto de la investigación con animales (estudios farmacológicos, de lesiones o estimulaciones, etc), como de estudios con humanos (estudios de neuroimagen). Los modelos animales han sido una herramienta muy importante para la identificación de componentes hereditarios del miedo y la ansiedad (para revisión ver (Stoppel y cols, 2006). Dichos modelos permiten superar algunas de las limitaciones que suponen los estudios con humanos, ya que posibilitan la modificación de genes potencialmente implicados en dichos fenómenos. Así, la generación de ratones mutantes y transgénicos, incluyendo los *knock-out* inducibles y los específicos de tejido han sido y son muy valiosos para la investigación biomédica (Kalueff, 2007). Algunos modelos animales permiten el estudio de conductas emocionales a partir de la cría de líneas seleccionadas (Landgraf y Wigger, 2002;Flint, 2003;Gordon y Hen, 2004), habiéndose utilizado con éxito parte de los resultados obtenidos en esos trabajos experimentales para arrojar luz sobre los

desórdenes humanos de ansiedad (Smoller y cols, 2001; Smoller y cols, 2003).

En resumen, al enfrentarnos a una situación de alarma se van a producir tanto respuestas fisiológicas encaminadas a preparar al organismo para responder físicamente con éxito, como respuestas conductuales de miedo y ansiedad, ambas controladas por prácticamente todos los sistemas del organismo, incluyendo el sistema nervioso.

1.1 Neuroquímica de la ansiedad

Los avances obtenidos durante las últimas décadas en neurofarmacología y biología molecular han permitido elucidar acerca del papel que juegan los múltiples sistemas de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas implicados en la fisiopatología de la ansiedad. Dentro de ellos se encuentran:

- ✱ Neurotransmisores peptídicos: sustancia P (McLean y Smith, 2001) y neuropéptido Y (Heilig, 2004).
- ✱ Aminoácidos neurotransmisores: glutamato (Moghaddam, 2002), GABA (Brambilla y cols, 2003a).
- ✱ Sistema cannabinoide endógeno (Chhatwal y Ressler, 2007)
- ✱ Sistema opioide endógeno (Cushman, Jr. y Kreek, 1974; Kreek, 1996).
- ✱ Hormonas: hormona o factor liberador de corticotropina (CRH o CRF, del inglés *corticotropin release hormone/factor*) (Risbrough y Stein, 2006), glucocorticoides (Korte, 2001), arginina-vasopresina (Bielsky y cols, 2004).
- ✱ Neurotransmisores monoaminérgicos: noradrenalina, serotonina y dopamina (Thiel y Schwarting, 2001; Stein y cols, 2002).

Aunque todos ellos participan en la regulación de la respuesta de ansiedad, los sistemas monoaminérgicos, serotoninérgicos, GABAérgicos y sistema CRF parecen ser la base principal de las alteraciones psicofisiológicas asociadas a los trastornos de ansiedad. Así, las anomalías a nivel tanto serotoninérgico como monoaminérgico contribuyen de manera significativa a la sintomatología de la ansiedad, y tanto sus acciones como sus circuitos son críticos en el tratamiento en humanos (Ressler y Nemeroff, 2000).

1.1.1. Sistema Noradrenérgico

El sistema noradrenérgico (SNA) ejerce una extensa influencia sobre los circuitos neurales subyacentes a procesos como el mantenimiento del estado de alerta y aquellos procesos cognitivos dependientes de estado. Los cuerpos celulares que contienen noradrenalina (NA) se encuentran dentro del *locus coeruleus* (LC) en los núcleos del tegmento lateral. El LC comprende el 70% de la innervación noradrenérgica del cerebro, proyectando a la corteza, estructuras límbicas y subcorticales, cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal (Ressler y Nemeroff, 2000). La mayoría de las neuronas del LC utilizan sinapsis convencionales, pero existen algunas evidencias de que la NA podría ser liberada en cantidades limitadas dentro de un espacio extracelular no sináptico, ejerciendo así una acción paracrina específica (Papadopoulos y Parnavelas, 1990).

Observaciones previas a nivel anatómico, electrofisiológico, farmacológico y conductual indican que el LC y el SNA participan fundamentalmente en dos funciones comportamentales (Berridge y Waterhouse, 2003):

1. Inducción y mantenimiento de la actividad neuronal del cerebro anterior, así como del estado de actividad del animal necesario para la adquisición de información.
2. Dentro del estado de alerta, la NA incrementa y/o modula la adquisición y posterior procesamiento de la información sensorial, actuando sobre procesos sensoriales, mnemónicos y motores. Esta modulación implica acciones distribuidas sobre múltiples regiones anatómicas, así como diversos subtipos de receptores.

A partir de estas observaciones se postula que la desregulación del LC y por tanto del SNA, conlleva deficiencias en diversos procesos tanto afectivos como cognitivos, asociados a su vez con alteraciones psicopatológicas tales como los desórdenes asociados al estrés (Berridge y Waterhouse, 2003).

Estudios electrofisiológicos sugieren que la actividad de las neuronas del LC está regulada principalmente por estímulos aversivos, de alarma, miedo o nocivos para el individuo (Redmond, Jr. y Huang, 1979; Grant y Redmond, Jr., 1984), los cuales inducen la

liberación de NA (Weiss y cols, 1980;Dunn, 1988;Gresch y cols, 1995). Se ha comprobado en el laboratorio que la exposición a diferentes tipos de estrés, como el estrés por inmovilización o el condicionamiento del miedo, incrementa la liberación de NA no sólo en el LC, sino también en el hipotálamo, el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral (Cassens y cols, 1981).

En tejido *post-mortem* de pacientes deprimidos se ha encontrado un incremento en los niveles tanto de los receptores adrenérgicos α_2 presinápticos (Meana y cols, 1992) como de los receptores β_2 (Mann y Arango, 1988;Meana y cols, 1992), lo cual estaría en concordancia con una posible desregulación e hipersensibilidad de la transmisión noradrenérgica en la depresión. Así, la hiperactividad de los receptores adrenérgicos α_2 podría inducir un descenso global en la actividad del LC y por tanto del SNA (Charney y cols, 1990). Una medida indirecta de la transmisión y de la señal transduccional de la NA es el uso de la hormona de crecimiento (GH, del inglés *growth hormone*) cuya liberación desde el hipotálamo se ve favorecida tras la administración de agonistas del receptor α_2 . Diversos grupos han confirmado que en pacientes depresivos (Coccaro y cols, 1991;Schildkraut y cols, 1992) y con ansiedad (Abelson y cols, 1991) la liberación de GH en respuesta a la clonidina (agonista de los receptores α_2 adrenérgicos) está atenuada, lo que se atribuye o bien a la hiperactividad de los autorreceptores presinápticos o bien a una baja sensibilidad de los receptores postsinápticos (Sullivan y Gratton, 1999). Además, se ha visto que la clonidina reduce la actividad noradrenérgica general y provoca ansiolisis (Brambilla y cols, 1994).

El CRF podría estar modulando la actividad neuronal del LC, participando en las respuestas autonómicas, comportamentales y electrofisiológicas asociadas al estrés, como confirma la presencia de fibras CRF-inmunoreactivas dentro del dicha región (Valentino y cols, 1993). Diversos estudios han demostrado que la administración intracerebroventricular (i.c.v.) (Valentino y cols, 1983;Valentino y Wehby, 1988) o local de CRF (Van Bockstaele y cols, 2001) incrementa la actividad del LC y la liberación de NA.

Aunque se ha visto que la exposición continuada a un estresor atenúa tanto la respuesta neuronal del LC como la liberación de NA con respecto un mismo estresor

(Nisenbaum y cols, 1991), cuando el estrés por inmovilización se aplica varias veces se produce, sin embargo, un incremento en la respuesta neuronal del LC (Pavcovich y cols, 1990), lo que apunta a que dicha tolerancia podría ser específica del tipo de estresor. El desarrollo de esta tolerancia contrasta con la bien documentada capacidad del estrés, tanto crónico como agudo, de incrementar la actividad y/o la cantidad de la enzima etapa-limitante de la biosíntesis de la NA, que es la tirosina hidroxilasa (TH) (Kramarcy y cols, 1984). Es decir, aunque el estrés crónico no provoca un incremento en la liberación de NA, sí da lugar a un aumento en la capacidad del sistema de liberar más NA, incrementando su tasa de síntesis. Se ha confirmado además, la participación del CRF en la regulación a la alza de la síntesis de TH en el LC, al menos en ciertas condiciones (Melia y Duman, 1991).

En estudios realizados con humanos con fobias específicas se ha visto que durante la exposición a un estímulo fóbico se produce un aumento de la concentración de NA y adrenalina en plasma, así como del gasto cardíaco, la presión sanguínea y el nivel de ansiedad subjetiva (Nesse y cols, 1985). Es más, individuos que padecen un desorden de ansiedad social muestran importantes incrementos de los niveles de NA en plasma durante determinados desafíos al compararlos con los controles (Stein y cols, 1992). Sin embargo, no se han encontrado diferencias en los niveles basales de NA de pacientes con desorden de ansiedad generalizada en comparación con individuos sanos (Gerra y cols, 2000).

1.1.2. Sistema Serotoninérgico

El papel del sistema serotoninérgico en la modulación de la ansiedad es complejo. La serotonina (5HT, 5-hidroxi-triptamina) desempeña diversas funciones en el cerebro, dentro de las cuales se encuentran: el sueño, la función cognitiva, la impulsividad, la función motora a través de la modulación de la respuesta límbica/afectiva, el apetito, el comportamiento sexual y la regulación de la respuesta al estrés por parte del eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA), estas tres últimas controladas directamente por el hipotálamo (Frazer y Hensler, 1990; Olivier y cols, 1998; Rainnie, 1999). A su vez, la 5HT está implicada en la homeostasis neuronal así como el crecimiento de neuronas y su

diferenciación (Meneses, 1999; Ressler y Nemeroff, 2000; Dalley y cols, 2002; Harro, 2002).

Las neuronas serotoninérgicas se encuentran localizadas principalmente en dos estructuras del tallo cerebral: los núcleos medial y dorsal del Rafe. Las proyecciones procedentes de ambos núcleos tienen patrones diferentes pero solapantes, y poseen distinta morfología axonal en función de cual sea su núcleo de origen (Ressler y Nemeroff, 2000). Las sinapsis serotoninérgicas se concentran más densamente en regiones límbicas que incluyen la amígdala y el núcleo del lecho de la estría terminal (NLET), a través de las cuales este sistema juega su papel en la modulación de la ansiedad (Davis y cols, 1997), así como el estriado ventral y el hipotálamo. Algunas proyecciones de la corteza prefrontal (CPF) tienen importantes efectos sobre la actividad serotoninérgica, ya que inhiben directamente la función del Rafe (Hajos y cols, 1998). Es más, esta vía parece estar hiperactiva en algunos estados de ansiedad y en pacientes deprimidos (Drevets y cols, 2007).

Al igual que ocurre con el LC, la actividad de los núcleos del Rafe puede ser modificada por las hormonas circulantes, entre ellas los glucocorticoides o los esteroides gonadales (Ressler y Nemeroff, 2000). Sin embargo, no está clara la activación del sistema serotoninérgico por el estrés, ya que, si bien es cierto que algunos resultados indican que las inervaciones serotoninérgicas que llegan a estructuras como la corteza prefrontal, la amígdala, el hipotálamo y el hipocampo se activan ante estímulos ansiogénicos, como el estrés social, el miedo condicionado y situaciones de conflicto (Adell y cols, 1997; Berton y cols, 1998; Amat y cols, 1998a; Amat y cols, 1998b), otros, sin embargo, no encuentran cambios en la actividad del Rafe utilizando estresores diferentes (Jacobs y Fornal, 1999).

Otros estudios sobre desórdenes de ansiedad han encontrado niveles de 5HT disminuidos en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes (Brewerton, 1995). Además, en casos de depresión y ansiedad parecen existir alteraciones en los niveles de receptores para 5HT. En tejido de corteza *post mortem*, se ha encontrado una elevada tasa de unión al receptor 5HT₂ (Mann y cols, 1995) y 5HT_{1A} (Matsubara y cols, 1991), lo que ha llevado a hipotetizar acerca de una posible regulación a la alta de dichos receptores en respuesta a

una transmisión presináptica disminuida. Otro estudio encontró una disminución en la densidad del receptor 5HT_{1A} en el hipocampo y la amígdala (Cheetham y cols, 1990) en contraposición con el incremento encontrado en la corteza, lo que apunta a una regulación diferencial entre los sistemas límbico y cortical. De hecho, la utilización de un agonista de dicho receptor como la m-CPP (meta-clorofenilpiperazina) incrementa los niveles de ansiedad en pacientes con trastornos de pánico, ansiedad generalizada y obsesivos compulsivos (Zohar y cols, 1987; Klein y cols, 1991).

Hay una clara evidencia de que los fármacos inhibidores de la recaptura de serotonina (IRS) usados para el tratamiento de la depresión tienen también efectos sobre la ansiedad. Las azapironas son agonistas parciales 5HT_{1A} con propiedades ansiolíticas y antidepresivas, de entre las que destaca la buspirona, que actúa también sobre receptores adrenérgicos y dopaminérgicos. Sin embargo se ha demostrado que los agonistas totales de este receptor no tienen los mismos efectos ansiolíticos e inducen incluso reacciones adversas, empeorando la ansiedad en pacientes con ataques de pánico (van Vliet y cols, 1996). A dosis bajas, los antagonistas 5HT₃ antagonizan la conducta agresiva y tienen efecto ansiolítico en animales de experimentación (Marsden, 1990).

1.1.3. Sistema GABAérgico

El GABA (ácido γ -aminobutírico) es el neurotransmisor inhibitorio más importante del sistema nervioso central de los vertebrados (Sieghart, 1995). Su acción se lleva a cabo a través de los siguientes receptores:

- GABA_A → receptor ionotrópico
- GABA_B → receptor metabotrópico

Ambos participan de forma importante en la función cerebral y son objetivo de una gran variedad de moduladores tanto endógenos como exógenos (Nutt y Malizia, 2001; Korpi y cols, 2002; Boehm y cols, 2004; Mombereau y cols, 2004). Dado que el receptor GABA_A es el principal responsable de la neurotransmisión inhibitoria rápida en el sistema nervioso central (SNC) adulto, juega un papel crucial en el control de la excitabilidad cerebral (Michels y Moss, 2007).

Numerosos estudios confirman que las drogas ansiolíticas que actúan sobre este sistema producen a su vez efectos antidepresivos (Kalueff, 2007). De hecho, se postula que la depresión está asociada a una disminución en la función GABAérgica, mientras que los antidepresivos, así como los fármacos ansiolíticos, tienden a incrementarla (Leung y Xue, 2003; Brambilla y cols, 2003b). Como ya se ha mencionado, la ansiedad está asociada con alteraciones en la secreción de muchas hormonas, incluyendo la hormona adrenocorticotropa (ACTH), los glucocorticoides, el CRF, las catecolaminas, la oxitocina, etc. Las sustancias que actúan sobre el sistema GABAérgico, tanto endógenas como exógenas son susceptibles de afectar a la secreción de alguna de estas hormonas (Arborelius y cols, 1999; Finn y cols, 2003). Por ejemplo, algunos agonistas GABAérgicos tipo benzodiacepina disminuyen los niveles de ACTH, corticosterona, oxitocina y prolactina que se liberan en respuesta a una situación estresante (Carrasco y Van de Kar, 2003).

Se sabe que el GABA interacciona directamente con otros neurotransmisores cerebrales, como la NA en la región límbica (Herman y cols, 2003b), lo que podría ser crítico ya que ambos neurotransmisores están muy implicados en el origen de la ansiedad (Coplan y Lydiard, 1998). Por tanto se ha planteado que mejorando la eficacia de las drogas GABAérgicas utilizadas en el tratamiento de la ansiedad se pueda al mismo tiempo mejorar los síntomas de depresión a través de la interacción del GABA con la NA, y viceversa (Kalueff, 2007).

Otros estudios neuroquímicos relacionados con el sistema GABAérgico y la ansiedad han revelado que la interrupción de la actividad GABAérgica puede provocar ansiogénesis (Martijena y cols, 2002; Kalueff y Nutt, 2007). Es más, ratones deficientes de la enzima glutamato descarboxilasa que participa en el metabolismo del GABA en el sistema nervioso central (Stork y cols, 2000a) presentan un comportamiento altamente ansiogénico (Kash y cols, 1999; Stork y cols, 2003). Utilizando una aproximación farmacológica se ha comprobado que aquellas drogas que interfieren con la recaptura de GABA (Gadea y Lopez-Colome, 2001a; Gadea y Lopez-Colome, 2001b; Gadea y Lopez-Colome, 2001c; Schmitt y cols, 2002), así como los inhibidores de la enzima GABA-transaminasa (Sherif y Ahmed, 1995; Dalvi y Rodgers, 1996) producen ansiolisis.

Debido a la interacción entre la formación de memorias aversivas y la neuroendocrinología del estrés, es posible que el tratamiento de la ansiedad con drogas GABAérgicas pueda, en paralelo, bloquear las memorias negativas recurrentes que no sólo complican el abordaje de dicho desorden (Kalueff y Nutt, 1996), sino que a su vez pueden ser origen de otros desórdenes, como por ejemplo, la depresión.

1.1.4. Sistema CRF

La hormona o factor liberador de corticotropina (CRH o CRF) es un neuropéptido de 41 aminoácidos que se ha identificado como el principal neurotransmisor implicado en las respuestas de estrés y ansiedad, iniciando las respuestas endocrinas, autónomas y comportamentales a diversos estresores (Dunn y Berridge, 1990) y regulando además la liberación de ACTH (Vale y cols, 1981; Rivier y Plotsky, 1986). De hecho, diversos desórdenes relacionados con la respuesta de estrés que parecen ser el resultado de la estimulación exacerbada de una o más vías reguladas por el CRF (Carrasco y Van de Kar, 2003).

Los efectos conductuales del CRF relacionados con la ansiedad implican la activación de los receptores CRF_1 y CRF_2 , teniendo más afinidad por los receptores de tipo 1. De hecho, no sólo se ha visto que los ratones transgénicos que sobreexpresan CRF muestran un comportamiento ansiogénico debido a la acción del CRF sobre el receptor CRF_1 (Stenzel-Poore y cols, 1994), sino que además la administración central de CRF produce ansiedad en los animales (Sutton y cols, 1982; Sherman y Kalin, 1987; Berridge y Dunn, 1989; Butler y cols, 1990).

■ **CRF_1** → existen numerosas evidencias que implican a este receptor con la ansiedad.

Se ha visto que los ratones *knock-out* para el receptor de CRF tipo 1 muestran una conducta menos ansiosa tanto en el laberinto en cruz elevado (LCE), como en la caja luz-oscuridad (CLO) en comparación con los animales no mutados (Timpl y cols, 1998; Smith y cols, 1998). Desde un punto de vista farmacológico, la inhibición de la expresión de CRF_1 mediante la administración central de oligodeoxinucleótidos antisentido (Liebsch y cols, 1995; Heinrichs y cols, 1997; Skutella y cols, 1998) así como

el tratamiento con antagonistas que bloquean específicamente el receptor resultan ser ansiogénicos en diferentes pruebas de ansiedad en los animales de laboratorio (Lundkvist y cols, 1996; Deak y cols, 1999; Okuyama y cols, 1999). Además, en primates no humanos el tratamiento con antalarmina, un antagonista del receptor CRF₁, induce un incremento de las respuestas de ansiedad al estrés social (French y cols, 2007).

- **CRF₂** → su implicación en la conducta de ansiedad no está tan clara. Si bien se ha observado un efecto ansiogénico en dos líneas de ratones que carecen de este receptor (Kishimoto y cols, 2000; Bale y cols, 2002), otros investigadores no encontraron dichas alteraciones en la conducta al compararlos con los controles (Coste y cols, 2000). Por otra parte, estudios en los que se ha administrado centralmente oligonucleótidos antisentido para el CRF₂ no han encontrado alteraciones en la ansiedad de los animales en el LCE, ni en la prueba de evitación defensiva (Heinrichs y cols, 1997; Liebsch y cols, 1999). Cuando se ha utilizado antisauvagina-30, un antagonista del receptor, se han obtenido resultados contradictorios. Mientras que tanto Radulovic y su grupo (Radulovic y cols, 1999) como Takahashi (Takahashi, 2001) encontraron que el tratamiento con el antagonista bloqueaba la conducta de ansiedad inducida por estrés en el LCE, otros investigadores hallaron que dicho péptido era ansiogénico (Kishimoto y cols, 2000).

Investigaciones recientes indican que la contribución del CRF a la ansiedad depende del tipo de estresor (natural o no aprendido, frente a respuestas condicionadas), pudiendo estar cada uno de ellos relacionado con distintos sustratos neurales (CRF-dependientes o CRF-independientes). Así, los primeros datos experimentales indican que los estresores de tipo sistémico (Kusnecov y cols, 1999), neurogénicos o las claves del miedo condicionado inducen un estado de ansiedad reversible mediante la administración de antagonistas selectivos del receptor de CRF (Merali y cols, 2004). Sin embargo, Merali (2004) ha sugerido que los estresores psicogénicos incondicionados (olor del predador, miedo a un espacio novedoso), podrían estimular circuitos neurales CRF-independientes, y por tanto la simple atenuación de los efectos del CRF sería insuficiente para promover una

respuesta ansiolítica ante este tipo de estresores. Recientemente, Todorovic y colaboradores (2007) han comprobado en ratones que la exposición a un estrés por inmovilización produce una manifestación de ansiedad en los animales que está mediada por los receptores CRF₂ septales, mientras que la activación tardía de los receptores CRF₁ hipocámpales serían los responsables de reestablecer los niveles basales de ansiedad.

1.2. Neuroanatomía de la ansiedad

El estudio de los circuitos anatómicos en los que participan los distintos sistemas de neurotransmisores que median la conducta de ansiedad dio un gran salto a partir del desarrollo y mejora de las técnicas neurotómicas, las cuales han favorecido la selectividad de las lesiones en el estudio con animales de experimentación, así como los avances en técnicas de neuroimagen que han permitido crear mapas neuropsicológicos que correlacionan con la emoción en humanos. Las aproximaciones obtenidas por los neurocientíficos clínicos ha impulsado el interés acerca de cómo la disfunción de determinados sistemas neuroquímicos y anatómicos van a dar lugar a distintas patologías, entre las que se encuentran los desórdenes de ansiedad.

Tanto la conducta de miedo como la de ansiedad surgen en respuesta a estímulos exteroceptivos visuales, auditivos, olfatorios así como interoceptivos, procedentes de las vísceras y de los sistemas endocrino y nervioso autónomo. La ansiedad también puede surgir como consecuencia de procesos cognitivos mediados por la anticipación o la interpretación subjetiva de los estímulos percibidos por los individuos. Así pues, los procesos emocionales pueden dividirse en (LeDoux, 1995):

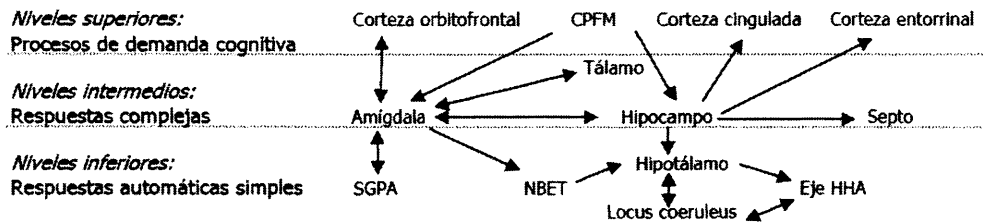
- Componentes evaluativos: la valoración del efecto emocional de un estímulo implica la evaluación de su valencia (por ejemplo, apetitivo frente a aversivo), su relación con las experiencias previas y la relación con el contexto de donde surge el estímulo.
- Expresión emocional: en la expresión de la respuesta emocional convergen manifestaciones conductuales, endocrinas y autonómicas.
- Experiencia emocional: describe el sentimiento subjetivo que acompaña a dicha

respuesta.

Todos estos aspectos del procesamiento emocional deben ser modulados por complejos sistemas neurobiológicos que previenen que dichas manifestaciones se vuelvan persistentes, excesivas y maladaptativas para los sujetos. Así, la ansiedad parece estar regulada por un intrincado eje neural organizado en niveles distintos que reflejan las diferencias en la demanda cognitiva, y que se extiende desde la neocorteza (particularmente las áreas frontal y temporal) hasta las vías monoaminérgicas del tallo cerebral (Shekhar y cols, 2002), teniendo un papel destacado el sistema límbico, dentro del cual se integra la amígdala. Una disfunción a nivel de cualquiera de estas zonas puede dar lugar a un patrón anormal de las respuestas afectivas y por tanto al desarrollo de desórdenes emocionales. La respuesta fisiológica de la ansiedad y el miedo se regulan en áreas del tronco cerebral. La **sustancia gris periacueductal** (SGPA) recibe aferencias descendentes de la corteza paralímbica y el sistema límbico, y aferencias ascendentes de las estructuras sensoriales. Se ha visto que la estimulación eléctrica en la zona ventrolateral de la SGPA produce inmovilización, hipotensión, bradicardia y analgesia, lo que supone una adaptación a un daño importante en el organismo. Por otro lado, la estimulación en la zona lateral de la SGPA produce huida cuando se hace caudalmente, y lucha cuando se hace rostralmente, y en ambos casos va acompañado de taquicardia y subida de la presión arterial (para revisión, ver (Graeff, 2003). El **locus coeruleus** (LC), proyecta eferencias hacia la corteza, áreas límbicas y tálamo (Aston-Jones y cols, 1996). Su estimulación, ya sea mediante métodos electrofisiológicos o farmacológicos, provoca una respuesta de ansiedad (Redmond, Jr., 1986), lo cual puede evitarse tanto lesionando esta región, como inyectando antagonistas adrenérgicos o sustancias ansiolíticas (Uhde y cols, 1984). Además, el hecho de que el LC se active fuertemente por el estrés o ante la presencia de estímulos aversivos (Stanford, 1995) y condicionantes emocionales (Rasmussen y Jacobs, 1986) hace que esta estructura sea fundamental en la generación de la 'reacción de alarma' (Redmond, Jr., 1986; Charney y Heninger, 1986).

Niveles de organización

Circuitos neurales relacionados con la ansiedad



Esquema 1. Circuitos neurales relacionados con la ansiedad. CPFM, corteza prefrontal medial; SGPA, sustancia gris periacueductal; NBET, núcleo basal de la estría terminal; eje HHA, eje hipotálamo hipófisis adrenal. Adaptado de (Finn y cols, 2003)

SISTEMA LÍMBICO Y ANSIEDAD

■ Corteza prefrontal medial

La corteza prefrontal medial (CPFm) está relacionada con el control inhibitorio de conducta (Lacroix y cols, 2000) interaccionando con el sistema serotoninérgico (Arrat y cols, 2005). Diversos estudios han demostrado que lesiones en este área incrementan la secreción tanto de ACTH como de corticosterona tras la aplicación del estrés por inmovilización, lo que implica un papel específico del estresor en su control sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Diorio y cols, 1993; Figueiredo y cols, 2003). Diversas evidencias experimentales sugieren que existe una organización topográfica de la CPFm en relación a las eferencias inhibitorias sobre los circuitos del eje HHA (Sesack y cols, 1989; Hurley y cols, 1991; Takagishi y Chiba, 1991).

■ Hipocampo

El neurocientífico inglés Jeffrey Gray (Gray, 1983; Gray y McNaughton, 1983) desarrolló una teoría sobre la 'neuropsicobiología de la ansiedad', en la que el sistema septo-hipocampal juega un papel crítico en la modulación de los estados de ansiedad, en particular, en la predicción del resultado de determinadas respuestas comportamentales. Esta hipótesis ha sido elaborada dentro de lo que se ha llamado 'el modelo comparador de la función hipocampal' (Gray, 1983; McNaughton y Gray, 2000; Vinogradova, 2001), según el cual, las 'células de lugar' del hipocampo, no sólo

codifican para la localización instantánea dentro de un contexto, sino que también codifican información acerca del pasado, el presente y el futuro inminente formando parte así de la red neural en la que se asienta la memoria episódica (Ferbinteanu y Shapiro, 2003; Jeffery y Hayman, 2004). Por ejemplo, las células de lugar del hipocampo se modulan (se 'encienden' o se 'apagan') en función de que el animal vaya a girar a la derecha o a la izquierda del laberinto para obtener una recompensa. Esta función hipocampal puede considerarse crucial para la conducta de valoración del riesgo, ya que antes de enfrentarse a cada situación se requiere una predicción acerca del resultado potencial de las diferentes estrategias conductuales (evitación o aproximación) que se pueden llevar a cabo. Además, el hipocampo parece estar involucrado en la interpretación de la intensidad del elemento estresante (Kant y cols, 1984; Herman y cols, 1998).

Son numerosos los estudios que apuntan a esta estructura como crítica en el proceso de retroalimentación negativa del eje HHA (Jacobson y Sapolsky, 1991; Herman y cols, 1996), debido a la elevada densidad de receptores de glucocorticoides presentes en el hipocampo, así como al hecho de que las lesiones hipocampales afecten fundamentalmente a la fase de recuperación de los niveles de glucocorticoides durante el estrés. Se ha visto que tras la exposición a un estrés crónico, la administración de altas dosis de corticosteroides durante un tiempo prolongado o durante el envejecimiento, se produce un descenso en los niveles de receptores de corticosteroides en el hipocampo, lo cual hace que se prolongue la respuesta del eje HHA (Sapolsky y cols, 1986; Issa y cols, 1990). Además, la administración sistémica de antagonistas del receptor de glucocorticoides de tipo I, de mineralocorticoides o MRs (del inglés, *mineralocorticoid receptor*) inhibe la habituación del eje HHA a un estrés repetido (Cole y cols, 2000), mientras que la de antagonistas de los receptores de glucocorticoides de tipo II o GRs (del inglés, *glucocorticoid receptor*) retarda el freno en la liberación de corticosterona que se produce en respuesta a la novedad (Ratka y cols, 1989).

La estimulación del hipocampo inhibe la secreción de glucocorticoides tanto en ratas,

como en humanos (Dunn y Orr, 1984). En la misma línea, se han realizado experimentos comprobando que tanto la extirpación del hipocampo como las lesiones del fórnix o del propio hipocampo incrementan la liberación de corticosterona y/o ACTH (FENDLER y cols, 1961;Knigge, 1961;Knigge y HAYS, 1963;Sapolsky y cols, 1984a). Además, el daño en el hipocampo también afecta a los niveles otras sustancias relacionadas con la respuesta al estrés como el CRF y/o AVP (arginina-vasopresina) (Sapolsky y cols, 1984b;Herman y cols, 1995). Esta regulación del eje HHA por parte del hipocampo parece ser específica tanto de la región como del estresor, siendo ejecutada principalmente por las neuronas localizadas en el área CA1 ventral. Por ejemplo, las lesiones provocadas en el subículo ventral, provocan una elevada secreción de glucocorticoides durante el estrés por inmovilización, campo abierto o laberinto en cruz elevado, pero no durante el estrés por hipoxia (Herman y cols, 1995;Mueller y cols, 2004).

La respuesta de miedo de los roedores ante una situación aversiva es la inmovilización. En dicha conducta parece estar implicada la transmisión colinérgica del sistema septo-hipocampal (Gray, 1983;Herman y cols, 1995;Takahashi, 1996;Mueller y cols, 2004). Cuando se lesiona dicho sistema, se consigue una atenuación de la respuesta de miedo muy similar a la obtenida tras el tratamiento con fármacos ansiolíticos, los cuales dificultan la actividad hipocampal *theta*, una onda rítmica que ha detectado en el cerebro de rata durante el estado de alerta ante una situación de peligro o amenaza (McNaughton, 1997). De hecho, se ha sugerido que la alteración de la función colinérgica del hipocampo puede llevar a una percepción errónea de la información sensorial, lo que provoca una sensación exagerada de miedo y ansiedad ante situaciones conflictivas (Smythe y cols, 1996). Esta teoría se ha demostrado inyectando sistémica o intrahipocampalmente escopolamina, un antagonista colinérgico, y comprobando que el bloqueo de la actividad colinérgica aumenta la ansiedad de los roedores en la caja luz-oscuridad (Smythe y cols, 1998).

Los receptores tipo MR localizados en el hipocampo también juegan un papel importante en la respuesta de ansiedad. De hecho, la administración intrahipocampal

de antagonistas de dicho receptor reduce los niveles de ansiedad en el LCE, el campo abierto, la prueba de enterramiento defensivo y la CLO (Smythe y cols, 1997; Bitran y cols, 1998). Este es un efecto ansiolítico rápido, lo que lleva a pensar que no se basa en un mecanismo de acción genómico.

■ Amígdala

Se piensa que la amígdala es crítica en la modulación de la salida de la información sensorial. Estudios recientes realizados con resonancia magnética funcional (RMf) han demostrado un incremento de la activación de la amígdala asociada con diversos estados de ánimo y con la ansiedad (Adolphs, 2001; Baxter y Murray, 2002; Anand y Shekhar, 2003). La actividad de esta estructura está regulada por el balance entre la señal excitatoria inducida por el glutamato y la inhibición mediada por el GABA (Rainnie y cols, 1991a; Rainnie y cols, 1991b), siendo este equilibrio particularmente importante para la modulación de las respuestas de ansiedad (Sajdyk y Shekhar, 1997). Es más, la amígdala parece ser un área crítica para los efectos anti-estrés inducidos por las drogas de tipo benzodiazepinas (Petersen y cols, 1985; Sanders y Shekhar, 1995). El papel específico de cada uno de los núcleos amigdalinos en la regulación de las respuestas afectivas ha sido caracterizado a partir del estudio del paradigma del condicionamiento del miedo (LeDoux, 1992; Davis, 1992b), ya que se ha visto que las lesiones en la amígdala no afectan a todos los tipos de ansiedad o conductas emocionales (Treit y cols, 1998; Amaral, 2002; Anderson y Phelps, 2002; Blundell y cols, 2003). La influencia de la amígdala sobre el sistema HHA está mediada tanto por el núcleo basolateral de la amígdala (NBLA), como por el núcleo central (NCeA). Lesiones en la región amigdalina reducen la secreción de ACTH y/o corticosterona tras el estrés (Allen y Allen, 1974; Beaulieu y cols, 1986; Van de Kar y cols, 1991; Feldman y cols, 1994; Dayas y Day, 2002), mientras que su estimulación tiene el efecto contrario (Matheson y cols, 1971; Redgate y Fahringer, 1973; Dunn y Whitener, 1986). Este control de la amígdala sobre la respuesta del eje HHA, al igual que ocurre con otras estructuras del sistema límbico es específico del estresor del área amigdalina. Así, la región medial de la amígdala responde principalmente a estresores

como inmovilización, natación, exposición a un predador y la interacción social (Cullinan y cols, 1995; Kollack-Walker y cols, 1997; Figueiredo y cols, 2003), pero no lo hace a la hipoxia, la hemorragia o la inyección de sustancias urticantes (Sawchenko y cols, 2000; Thirivikraman y cols, 2000; Figueiredo y cols, 2003).

La amígdala es también una estructura diana potencial para los glucocorticoides, ya que expresa tanto MRs como GRs (Fuxe y cols, 1985; Aronsson y cols, 1988; Arriza y cols, 1988; Ahima y Harlan, 1990). También el CRF, a través de sus receptores CRF₁ en la amígdala (Potter y cols, 1994), regula los procesos de ansiedad y miedo (Heinrichs y cols, 1994; Holsboer, 1999), principalmente a nivel del NCeA y el NLET (LeDoux, 1995; Lee y Davis, 1997). El tratamiento subcrónico de corticosterona en la amígdala incrementa el grado de ansiedad en el LCE, y eleva la expresión de CRF, así como de neuronas que lo expresan en el NCeA (Shepard y cols, 2000).

- La **corteza cingulada anterior**, al menos en humanos, se piensa que participa en la evaluación de la relación entre las acciones y sus consecuencias, los resultados erróneos y los de refuerzo, y realizando elecciones entre diferentes estrategias comportamentales basándose en sus resultados potenciales (Rushworth y cols, 2004).
- El **núcleo del lecho de la estria terminal** (NLET) parece formar parte del sistema motor relacionado con las respuestas emocionales específicas (Holstege y cols, 1985), y por tanto está implicado específicamente en la respuesta a la señales aversivas difusas, como por ejemplo, una luz brillante (Davis, 1998; Walker y cols, 2003).

2. La respuesta fisiológica de estrés

Tanto los humanos como el resto de los animales sufren una serie de cambios fisiológicos y conductuales característicos en respuesta a la exposición a situaciones estresantes, lo cual les va a permitir mejorar o potenciar su respuesta ante dicha situación adversa.

Algunas de las respuestas fisiológicas asociadas a la respuesta de estrés son (Sapolsky, 2000; Sapolsky y cols, 2000; Habib y cols, 2001):

1. Movilización de energía y del flujo sanguíneo para mantener la función muscular y cerebral
2. Focalización de la atención en el peligro percibido
3. Incremento de utilización de glucosa en el cerebro
4. Incremento en la tasa cardíaca y respiratoria
5. Modulación de la respuesta inmune
6. Inhibición de la conducta sexual
7. Inhibición del apetito

Se define por tanto el **estrés** como un estado psicobiológico en el que el individuo percibe o experimenta una situación de amenaza física o emocional que no es capaz de afrontar (Gunnar y Quevedo, 2007). En general, estos estresores pueden agruparse dentro de tres grandes categorías (Van de Kar y Blair, 1999):

1. **Estresores psicológicos** basados en una respuesta aprendida hacia una amenaza dentro de una situación adversa (miedo, ansiedad, exposición a un entorno nuevo o incontrolable)
2. **Estresores físicos y ambientales** que conllevan además un componente psicológico más o menos fuerte (exposición al calor o al frío, ruido, inmovilización, etc).
3. **Estresores biológicos que alteran la homeostasis:** hemorragia, enfermedad, etc.

En dicha respuesta de estrés participan tanto el SNC, como componentes periféricos (Chrousos y Gold, 1992; Habib y cols, 2001):

- Elementos del SNC situados en el hipotálamo y en el tronco cerebral:
 - Neuronas parvocelulares que secretan CRF
 - Neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretoras de la hormona arginina-vasopresina (AVP).
 - Neuronas tipo CRF de los núcleos paragigantocelular y parabraquial de la bulbo raquídeo y el LC
 - Grupos celulares noradrenérgicos situados en el bulbo y el puente.
- Elementos periféricos:
 - Ramas periféricas del eje HHA
 - Sistema eferente simpático y parasimpático

Es casi igual o más importante la participación de un mecanismo homeostático inhibitorio (Cannon, 1929) que pueda compensar la activación previa del sistema de estrés y devuelva al organismo al equilibrio interno necesario, puesto que la hiper/hipo-activación crónica de dicho eje puede dar lugar a estados que pueden llegar a ser nocivos para la salud (Chrousos y Gold, 1992; Chrousos, 1998). Así pues, la respuesta de estrés tiene un doble efecto, uno beneficioso para el individuo en cuanto a que le prepara para reaccionar frente a las situaciones peligrosas y uno negativo en cuanto al desgaste que puede provocar una activación prologada. El *Síndrome General de Adaptación* (Seyle, 1936) recoge las etapas fisiológicas por las que pasan los individuos ante una situación estresante que incluyen: i) la reacción de alarma, en la que los individuos se enfrentan a una situación de amenaza, ii) la fase de resistencia, en la que el organismo comienza a frenar la respuesta fisiológica de estrés y iii) la fase de agotamiento que se produce cuando las circunstancias estresantes perduran en el tiempo o son de considerable magnitud, pudiendo llegarse incluso a una pérdida de la capacidad de adaptación del organismo.

Para estudiar el impacto que produce el estrés se han desarrollado distintos modelos animales en función del tipo de estresor (físico, biológico o psicológico). Sin

embargo, hay que tener en cuenta que al igual que ocurre con otros modelos animales utilizados en la investigación científica, no se puede medir la evaluación cognitiva que un individuo realiza de cada experiencia y que va a ser muy importante para modular la magnitud del impacto de la situación estresante.

Es necesario entender el estrés como un suceso multifactorial en el que influyen elementos como la interacción entre el estresor y la reacción de estrés que desencadena; la evaluación cognitiva que realiza el individuo de la situación adversa, la cual va a estar muy influenciada tanto por el contexto en el que se mueva dicho individuo, como por su propia capacidad o no de resolución de la situación de emergencia; y en último término, la estrategia que se va a llevar a cabo y que deriva de la interacción de los elementos ya mencionados. Las situaciones estresantes a las que se expone un individuo provocan en él un cambio, una modificación en el repertorio de respuestas de que dispone, las cuales le ayudarán, desde un punto de vista adaptativo, a la hora de enfrentarse a futuras situaciones adversas (Gold y cols, 1988a; Gold y cols, 1988b).

La activación selectiva de diferentes áreas cerebrales en respuesta a una situación estresante puntual viene dada por las diferencias en la carga física que supone el estresor, su intensidad, la percepción somática y sensorial, así como del procesamiento cognitivo y emocional (Pacak y Palkovits, 2001). Las amenazas predecibles son procesadas en primer lugar por las áreas límbicas, incluyendo la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal (Herman y cols, 2003b). Sin embargo, bajo las condiciones del laboratorio, las situaciones estresantes son mucho más controladas. Común a la mayoría de los estresores es el hecho de que las respuestas adaptativas de los animales para mantener su homeostasis interna incluyen la activación del eje HHA, así como del sistema nervioso autónomo (Engelmann y cols, 2004).

2.1. Sistema nervioso autónomo

El sistema nervioso autónomo responde rápidamente a las situaciones adversas o estresantes regulando un amplio abanico de sistemas: cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, renal, endocrino etc.

El sistema nervioso autónomo tiene dos ramas (Habib y cols, 2001):

- **Rama simpática** → se activa en situaciones de estrés, particularmente si el sujeto se dispone a emitir respuestas de enfrentamiento (lucha) o evitación (huida) (Valentino y cols, 1993). La inervación simpática de los órganos periféricos comienza en el hipotálamo, el cual envía información a la médula espinal o bien directamente, desde el núcleo paraventricular (NPV), o bien a través del núcleo del tracto solitario (NTS). Desde la columna intermedio-lateral de la médula espinal parten las fibras preganglionares cuyos nervios sinaptan en la cadena bilateral de ganglios simpáticos, donde se encuentran las neuronas simpáticas post-ganglionares que inervan extensamente la musculatura lisa y esquelética, el corazón, el hígado, el intestino, la grasa y muchos otros órganos. Estas neuronas preganglionares son principalmente colinérgicas, mientras que las postganglionares son fundamentalmente noradrenérgicas.

La noradrenalina (NA) liberada tras la activación de la rama simpática induce distintas funciones interaccionando con diferentes tipos de receptores (Valentino y cols, 1993):

- Unión a receptores β_1 -adrenérgicos: produce un incremento de la fuerza y contracción cardíaca y a β_2 -adrenérgicos: estimulan la vasodilatación de las arteriolas coronarias y relajan la musculatura bronquial.
- Unión a receptores α -adrenérgicos: induce la contracción de vasos sanguíneos de los tejidos periféricos, redirigiendo el flujo sanguíneo hacia el cerebro y el corazón.
- Aparte de estas modificaciones fisiológicas, el sistema simpático produce cambios metabólicos importantes en el organismo, entre los que destaca su acción en el hígado, donde estimula la glucogenolisis y proporciona un aporte adicional de glucosa a los tejidos que demanden más energía (Vingerhoets, 1985).

Por otro lado, las neuronas simpáticas preganglionares activan directamente la médula adrenal, la cual está formada con neuronas postganglionares modificadas que no

inervan otros órganos. Las células adrenomedulares liberan al torrente circulatorio principalmente adrenalina (A) y en menor grado NA, actuando sobre estructuras que no están innervadas directamente por el SNA. Ante una situación de estrés crónico, esta vía permanece activa y, para evitar daños en el organismo, los tejidos tienden a disminuir la expresión de sus receptores tanto α - como β -adrenérgicos (Mackenzie y cols, 1980; Stone, 1983).

■ **Rama parasimpática** → La función principal del sistema nervioso parasimpático es la de provocar o mantener un estado corporal de descanso o relajación tras un esfuerzo o para realizar funciones importantes como es la digestión, micción o el acto sexual. Realiza funciones opuestamente complementarias con respecto al sistema nervioso simpático y el equilibrio entre ambos sistemas regula el funcionamiento del organismo en condiciones normales.

Además de los neurotransmisores clásicos de las ramas simpática y parasimpática, en los distintos niveles del SNA las neuronas expresan distintos neuropéptidos. Así, se han encontrado CRF, neuropéptido Y, somatostatina y galanina en las neuronas vasoconstrictoras noradrenérgicas postganglionares, mientras que en las neuronas de tipo colinérgico se ha descubierto péptido intestinal vasoactivo (VIP, del inglés *vasoactive intestinal peptide*), sustancia P y calcitonina (Habib y cols, 2001).

2.2. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El CRF es el principal regulador hipotalámico del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), y va a estimular la liberación de ACTH por parte de la hipófisis anterior (Guillemin y Hearn, 1955). Además, las neuronas parvocelulares del NPV son esenciales para el control de la secreción de la ACTH, y sintetizan tanto AVP como CRF (Vale y cols, 1981; Abou-Samra y cols, 1987). Ambos son secretados por los terminales axónicos en la zona externa de la eminencia media, desde donde van a estimular de forma sinérgica la secreción de ACTH por parte de las células corticotropas de la hipófisis anterior (Antoni, 1993). Hoy en día, el complejo circuito neuronal que controla la actividad de las neuronas parvocelulares está bien caracterizado (para revisión ver (Herman y cols, 2003a).

La corteza adrenal es la diana principal de la ACTH, donde regula la secreción tanto de glucocorticoides como de andrógenos por parte de la zona fascicular y reticular respectivamente, y participa en el control de la liberación de la aldosterona en la zona glomerular (Andreis y cols, 1992). En la liberación de glucocorticoides están implicados, además, la actividad de los nervios periféricos autónomos, así como otras hormonas y citoquinas (Ottenweller y Meier, 1982; Bornstein y Chrousos, 1999).

Los glucocorticoides son los efectores últimos del eje HHA. Son hormonas pleiotrópicas que ejercen sus acciones a través de receptores intracelulares ampliamente distribuidos (Munck y cols, 1984). Juegan un papel fundamental no sólo en la regulación basal del eje sino también en la culminación de la respuesta al estrés actuando sobre el hipotálamo, la hipófisis, y otros centros extra-hipotalámicos. Entre los efectos más destacados de los glucocorticoides están los metabólicos y su capacidad para afectar el funcionamiento de distintos sistemas fisiológicos, como el cardiovascular, el inmunológico o el nervioso, y, en relación con este último, influir sobre la conducta de los individuos (Munck y cols, 1984; Holsboer y cols, 1994).

La retroalimentación negativa en la secreción tanto de CRF como de ACTH limita la duración de la exposición de los tejidos del organismo a la acción de los glucocorticoides, minimizando así los efectos catabólicos, lipogénicos e inmunosupresores de dichas hormonas (Chrousos y Gold, 1992; Habib y cols, 2001).

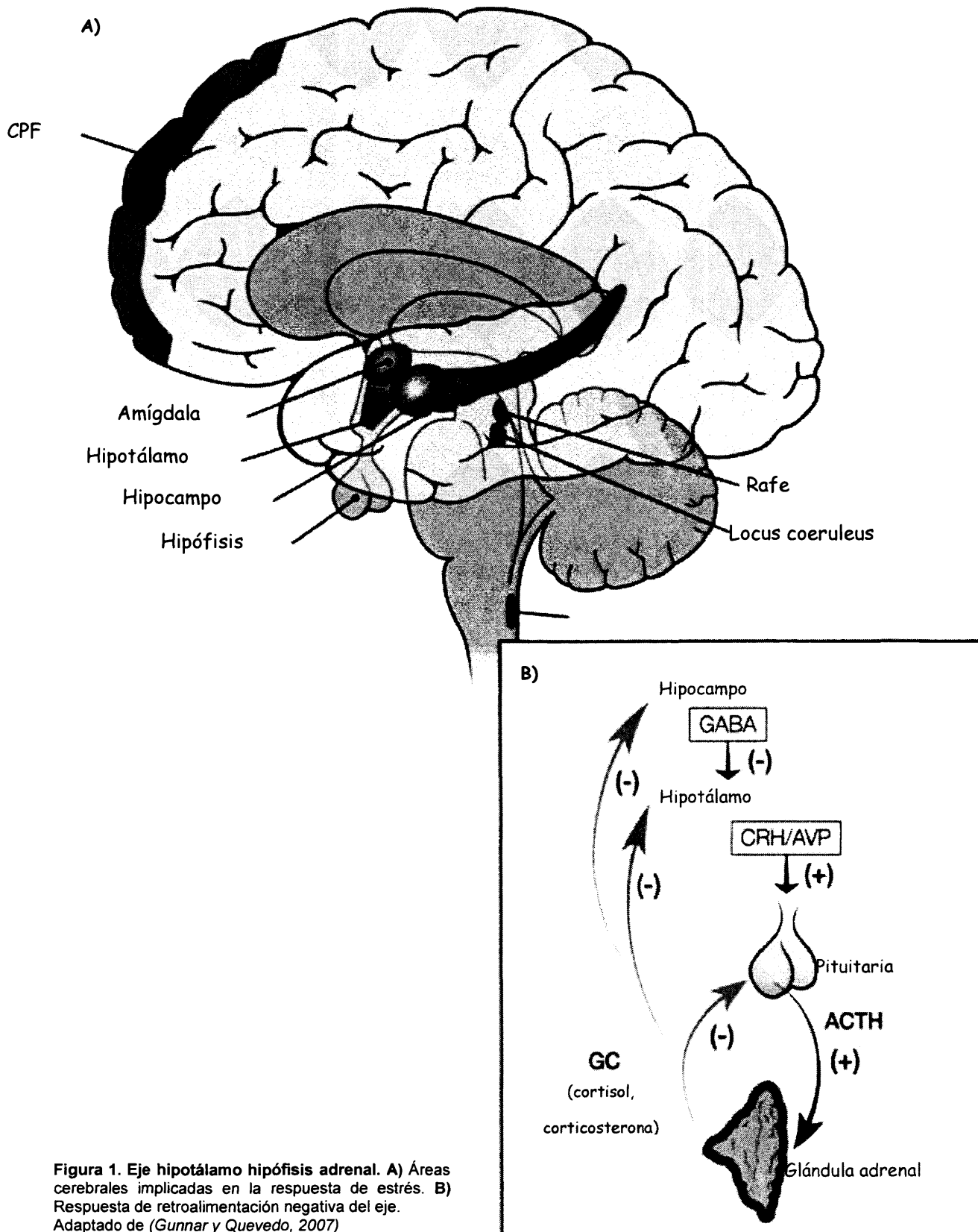


Figura 1. Eje hipotálamo hipófisis adrenal. A) Áreas cerebrales implicadas en la respuesta de estrés. B) Respuesta de retroalimentación negativa del eje. Adaptado de (Gunnar y Quevedo, 2007)

2.3. Los receptores de glucocorticoides

Como ya se ha mencionado, la principal acción de los glucocorticoides está medida por dos tipos de receptores, los **receptores de mineralocorticoides** o de **tipo I** (MRs) (Gerlach y McEwen, 1972; McEwen, 1979) y los **receptores de glucocorticoides** o de **tipo II** (GRs) (Reul y de Kloet, 1985). Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares para esteroides y participan en la regulación de la expresión de diversos genes. Su estructura consta de dos dominios funcionales:

- Sitio de unión para el ADN, denominado DBD (del inglés, *DNA-binding*).
- Sitio de unión para el ligando o LDB (del inglés, *ligand-binding*)

Estos dominios presentan un alto grado de homología entre ambos tipos de receptores, residiendo la especificidad de cada uno en la región N-terminal. Los glucocorticoides tienen 10 veces más afinidad por los MRs que por los GRs y por tanto es la concentración de hormona circulante la que va a determinar qué receptor es activado: a bajas concentraciones se activarían únicamente los MRs y a elevadas concentraciones, como en los picos circadianos y durante las situaciones de estrés, ambos (Reul y de Kloet, 1985; de Kloet y cols, 2000). La aldosterona también se une con 10-20 veces más afinidad a los receptores de tipo I que a los de tipo II. Sin embargo, la concentración de esta hormona es de 100 a 1000 veces menor que la de la corticosterona, por lo que la probabilidad de que llegue a activar a los GRs es escasa. Su función principal la ejercería sobre los receptores del hipotálamo anterior y el cerebelo (Funder, 1993).

En ausencia de ligando, los receptores de corticosteroides permanecen en el citoplasma de la célula formando parte de un gran complejo multiproteico constituido por el polipéptido del receptor, dos moléculas de *hsp90* (proteína de choque térmico 90, del inglés *heat shock protein 90*) y otras proteínas. Una vez que la hormona interacciona, el receptor se disocia y se transloca dentro del núcleo donde se une como un homodímero a un elemento de respuesta a glucocorticoides (GREs) situado en la región promotora de los genes de respuesta a glucocorticoides, modulando su expresión positiva o negativamente, dependiendo de cuál sea la secuencia GRE y el contexto del promotor. Cabe indicar que este receptor también puede modular la expresión génica de forma independiente a la

unión con GRE, mediante su interacción física con otros factores de transcripción, como la proteína AP-1 y el factor nuclear NF- κ B (Bamberger y cols, 1996). El receptor tipo GR puede unirse directamente al ADN para reprimir su propia expresión, así como la de la proopiomelanocortina (POMC) (Webster y Cidlowski, 1999; Sapolsky, 2000). Además, se han descrito efectos rápidos y breves de los glucocorticoides que podrían realizarse no a través de su interacción con los receptores intracelulares, sino interaccionando directamente con la membrana plasmática (Chen y cols, 1991; Sandi y cols, 1996; Murphy y Regan, 1998; Venero y Borrell, 1999; Makara y Haller, 2001; Karst y cols, 2005).

2.3.1. Distribución cerebral

Los receptores para glucocorticoides se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, tanto a nivel central como periférico. La concentración de GRs es unas 10 veces mayor que la de MRs en general en todo el cerebro. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los niveles de ambos receptores pueden variar tras la exposición a distintos tipos de tratamientos o experiencias, como la administración de glucocorticoides, el estrés crónico o el paso de los años (Van Eekelen y de Kloet, 1992; Patacchioli y cols, 1998; Meyer y cols, 2001), siendo incluso posible encontrar variaciones en la densidad de receptores como consecuencia del ritmo circadiano (Spencer y cols, 1990). De hecho, existe una correlación entre el número de receptores y la respuesta a la hormona tanto *in vivo* como *in vitro* (Burnstein y Cidlowski, 1992). Recientemente se ha visto que los niveles de GRs y MRs se ven afectados de diferente forma tras la administración de corticosterona a ratas previamente adrenalectomizadas. Aunque ambos sufren un descenso progresivo en sus ARNm que se acentúa cuanto mayor es la dosis de corticosterona, los efectos son significativos sobre los GRs con una dosis de 10 mg/Kg, mientras que es necesaria una dosis de 50 mg/Kg para afectar a los niveles de ARNm de los MR. También se comprobó que la adrenalectomía indujo un aumento en los niveles de ARNm para ambos tipos de receptores únicamente en el tercer día tras la operación, desapareciendo las diferencias en el octavo día (Hugin-Flores y cols, 2004).

La distribución en el SNC responde a su implicación en la regulación de la

conducta emocional, y en procesos de aprendizaje y memoria (LeDoux, 1993;McNaughton, 1997;Kempermann y Gage, 2002):

- MRs → su distribución es bastante heterogénea, con altas concentraciones en:
 - Sistema límbico: hipocampo y septum dorsolateral
 - Cerebelo
 - Núcleos sensoriales y motores del tronco cerebral
- GRs →: ampliamente distribuidos por todo el cerebro, presentando una concentración muy alta en:
 - Sistema límbico
 - Neuronas parvocelulares del NPV del hipotálamo, lugar en el que los glucocorticoides ejercen el control negativo sobre la síntesis tanto de CRH como de AVP.
- Ambos tipos de receptores colocalizan en:
 - NPV del hipotálamo
 - Núcleo del tracto solitario (NTS)
 - Septum
 - Amígdala
 - Hipocampo: donde su expresión es mayor en las áreas CA1 y CA2, y puede llegar a ser un 50% mayor para los receptores de tipo I.

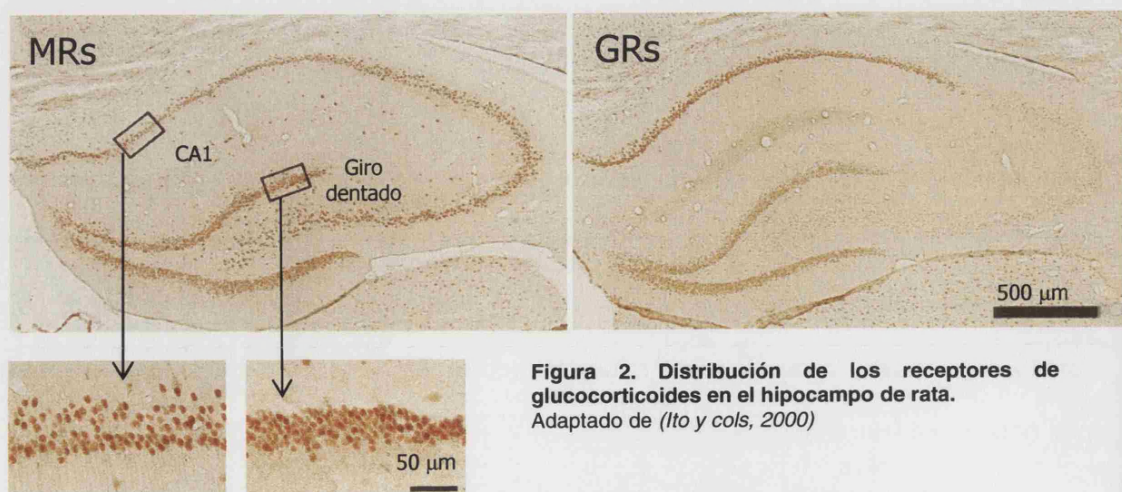


Figura 2. Distribución de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo de rata.
Adaptado de (Ito y cols, 2000)

Las alteraciones en el control negativo de la respuesta del eje HHA por parte de los glucocorticoides es uno de principales factores neurobiológicos causantes de trastornos psiquiátricos (Young y cols, 1991;Yehuda, 2001). La importancia de los GRs y MRs hipocampales en dichas alteraciones no está limitada a su participación en el control negativo de la respuesta, ya que la activación o el bloqueo de estos receptores parece modular, además, otros sistemas relacionados con la memoria, la reactividad comportamental, la ansiedad y el miedo (Korte y cols, 1995;de Kloet y cols, 1998) Así, existen numerosos estudios acerca del papel modulador de los glucocorticoides sobre el sistema serotoninérgico y dopaminérgico, mediado principalmente por los receptores de tipo GR (Chaoulloff, 1995;Meijer y de Kloet, 1998;Lopez y cols, 1998;Farisse y cols, 2000;Wissink y cols, 2000). Por ejemplo, se ha visto que las inyecciones sistémicas de corticosterona (Summers y cols, 2000), así como protocolos de estrés agudo por ruido o crónico por ruido o inmovilización (Boadle-Biber y cols, 1989;Shimizu y cols, 1992) incrementan la tasa de recambio de la 5HT.

2.3.2. Acciones

ACCIONES PERIFÉRICAS

La más destacable es la que desempeñan estos receptores participando en la regulación de la presión sanguínea de forma contraria (van den Berg y cols, 1989):

- MR → media el aumento de la presión sanguínea
- GR → media la disminución

ACCIONES CENTRALES

Retroalimentación negativa

Como ya se ha comentado, el control negativo del eje HHA por parte de los glucocorticoides es fundamental para garantizar la vuelta al equilibrio del medio interno.

Este proceso se lleva a cabo mediante, al menos, tres mecanismos independientes, pero relacionados:

1. *Mecanismo rápido no genómico*: se produce en los primeros minutos tras la activación de la respuesta de estrés y es más efectivo cuanto mayor es el incremento en el nivel de corticosterona circulante. El aumento en los niveles

de corticosterona inhibe la liberación de CRF y ACTH (Brann y Mahesh, 1995).

2. *Mecanismo intermedio (probablemente genómico)*: se dispara entre media hora y 90 minutos tras la activación del eje, inhibiendo la síntesis de CRF así como la síntesis y liberación de CRF y ACTH. Probablemente esta acción se realiza a nivel hipocampal. La fuerza de inhibición de este mecanismo es proporcional a la actividad del eje HHA (Sapolsky y cols, 1984a; Herman y cols, 1989)
3. *Mecanismo tardío*: ocurre durante las doce horas posteriores, y actúa fundamentalmente a nivel genómico reduciendo la síntesis y almacenamiento de ACTH en la hipófisis, aunque también está implicado el hipocampo (Jacobson y Sapolsky, 1991).

La implicación de cada tipo de receptor no está clara:

- MRs → se relacionan con el control tónico del hipocampo sobre la actividad del eje.
- GRs → median el control negativo frente a elevados niveles de corticosterona circulante.

Plasticidad neural

Los efectos que los glucocorticoides ejercen sobre los procesos de plasticidad y supervivencia neuronal son variados. Algunos de ellos son los siguientes:

- Los receptores de tipo I localizados en las células granulares del hipocampo presentan propiedades antiapoptóticas, requiriéndose unos niveles mínimos de corticosteroides para su supervivencia (Hassan y cols, 1996; Almeida y cols, 2000).
- La exposición crónica a niveles elevados de glucocorticoides puede llevar a degeneración de los árboles dendríticos de las neuronas piramidales de las áreas CA1 (Donohue y cols, 2006), CA3 del hipocampo (Magariños y McEwen, 1995; Sousa y cols, 2000; Stewart y cols, 2005) y de las células granulares del giro dentado del hipocampo (Haynes y cols, 2003) e incluso a la muerte de las mismas.
- Los glucocorticoides pueden afectar a la expresión de varios factores tróficos implicados en procesos de plasticidad neural (Chao y McEwen, 1994; Smith y cols,

1995):

- Factor de crecimiento neural (NGF, del inglés *neural growth factor*)
- Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF; del inglés *brain derived nerve factor*)

■ También puede verse afectada la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs, del inglés *cell adhesion molecules*) (Grant y cols, 1996; Sandi y Loscertales, 1999; Grootendorst y cols, 2001):

- CAM neural (NCAM)
- L1

La modulación sináptica de los corticosteroides se representa en forma de U-invertida, tanto en la regulación de la potenciación de larga duración o LTP (del inglés, *long term potentiation*), como de la depresión de larga duración o LTD (del inglés, *long term depression*). Este tipo de modulación significa que tanto niveles mínimos como máximos de glucocorticoides endógenos producen la supresión de la LTP hipocampal (Stanton, 1996; Coussens y Teyler, 1996), mientras que concentraciones moderadas la potencian (Lupien y McEwen, 1997).

Otra serie de estudios han mostrado que si las ratas son expuestas a la exploración de un ambiente novedoso, lo cual induce la liberación de corticosterona, se inhibe la expresión de la LTP (Xu y cols, 1997; Xu y cols, 1998). En cambio, este mismo tratamiento conductual produce el efecto contrario sobre la LTD, facilitándola.

3. Moléculas de adhesión celular neural

Las moléculas de adhesión celular (CAMs, del inglés *cellular adhesion molecules*) son glicoproteínas de membrana que median interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular estableciendo así un anclaje físico de las células a su entorno, lo que es imprescindible para su proliferación, crecimiento y migración (Kiss y Muller, 2001). Hoy en día, también se sabe que las CAMs pueden activar cascadas de señales celulares gracias a que poseen un elemento intracelular que les permite acoplar los cambios dinámicos que se producen a nivel extracelular con los eventos intracelulares que controlan la morfología (Lamprecht y LeDoux, 2004). Así pues, los fenómenos de adhesión y señalización son procesos mutuamente interdependientes (Kamiguchi y Lemmon, 2000).

Se han localizado diversos tipos de CAMs en las sinapsis del sistema nervioso central que pueden clasificarse en cuatro grupos (Kiss y Muller, 2001):

- Integrinas
- Cadherinas
- Neurexinas y neuroliginas
- Superfamilia de las inmunoglobulinas

Las moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas se caracterizan por la presencia de un motivo identificado por primera vez en las proteínas denominadas inmunoglobulinas (ver resumen, (Williams y Barclay, 1988). Poseen uno o más dominios tipo inmunoglobulina (Ig) que median los procesos de reconocimiento y adhesión, y normalmente una o más repeticiones de fibronectina III (FnIII) (Walsh y Doherty, 1997). Esta superfamilia incluye diversas subfamilias que se expresan en un gran número de tejidos tanto durante el desarrollo como en las espinas dendríticas del individuo adulto (Edelman y Crossin, 1991), participando en la transmisión entre neuronas y en la interacción entre células gliales y células nerviosas (Vernadakis, 1996).

Estas proteínas pueden establecer uniones homofílicas y/o heterofílicas con otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas con una fuerza de interacción variable (Brummendorf y Rathjen, 1996). Además, la mayoría de estas moléculas poseen homólogos en animales invertebrados, lo que sugiere la importancia de la adhesión celular

como un mecanismo altamente conservado en la evolución (Edelman, 1987).

Dentro de las moléculas pertenecientes a esta superfamilia, destacamos la molécula de adhesión celular neural (NCAM, del inglés *neural cellular adhesion molecule*), por su localización en el sistema nervioso central y su participación en numerosos procesos neurales.

3.1. Estructura molecular de NCAM

La molécula NCAM presenta una región extracelular formada por cinco módulos tipo inmunoglobulina y dos regiones homólogas con la fibronectina de tipo III (FnIII). A través de este dominio extracelular NCAM media interacciones tanto homofílicas como heterofílicas, cis y trans (Rønn y cols, 2000). Mediante modificaciones post-traduccionales ha sido posible inhibir las interacciones entre células mediadas por NCAM y descubrir así su papel en la remodelación sináptica dependiente de actividad (Durbec y Cremer, 2001) y en el almacenamiento de memoria (Murphy y Regan, 1998).

Existen al menos de 20 a 30 isoformas diferentes generadas por corte y empalme (*splicing*) alternativo, o bien por modificaciones post-traduccionales (Cunningham y cols, 1987). En el cerebro, NCAM se encuentra principalmente en tres isoformas generadas a partir del *splicing* alternativo de un único gen formado por 26 exones y que se nombran en función de su peso molecular:

- NCAM-120 (120 kDa)
- NCAM-140 (140 kDa)
- NCAM-180 (180 kDa)

Aunque las tres isoformas presentan dominios extracelulares similares difieren en la longitud del dominio citoplasmático y la forma de anclarse a la superficie de la membrana. Así, NCAM-140 y NCAM-180 son glicoproteínas integrales de membrana, mientras que NCAM-120 está anclada a la membrana mediante un enlace glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Jorgensen, 1995) (ver Figura 3). En individuos adultos, NCAM-140 y NCAM-180 se expresan fundamentalmente en neuronas (Gegelashvili y cols, 1993), mientras que NCAM-120 lo hace predominantemente sobre células gliales (Noble y cols, 1985).

Mediante un estudio de microscopía electrónica se ha podido constatar que en las sinapsis de CA3/CA4, NCAM-140 se localiza tanto en la membrana pre- como en la postsináptica estableciendo anclajes hetero- y homofílicos, mientras que NCAM-180 se encuentra únicamente en las postsinápticas (Schuster y cols, 2001).

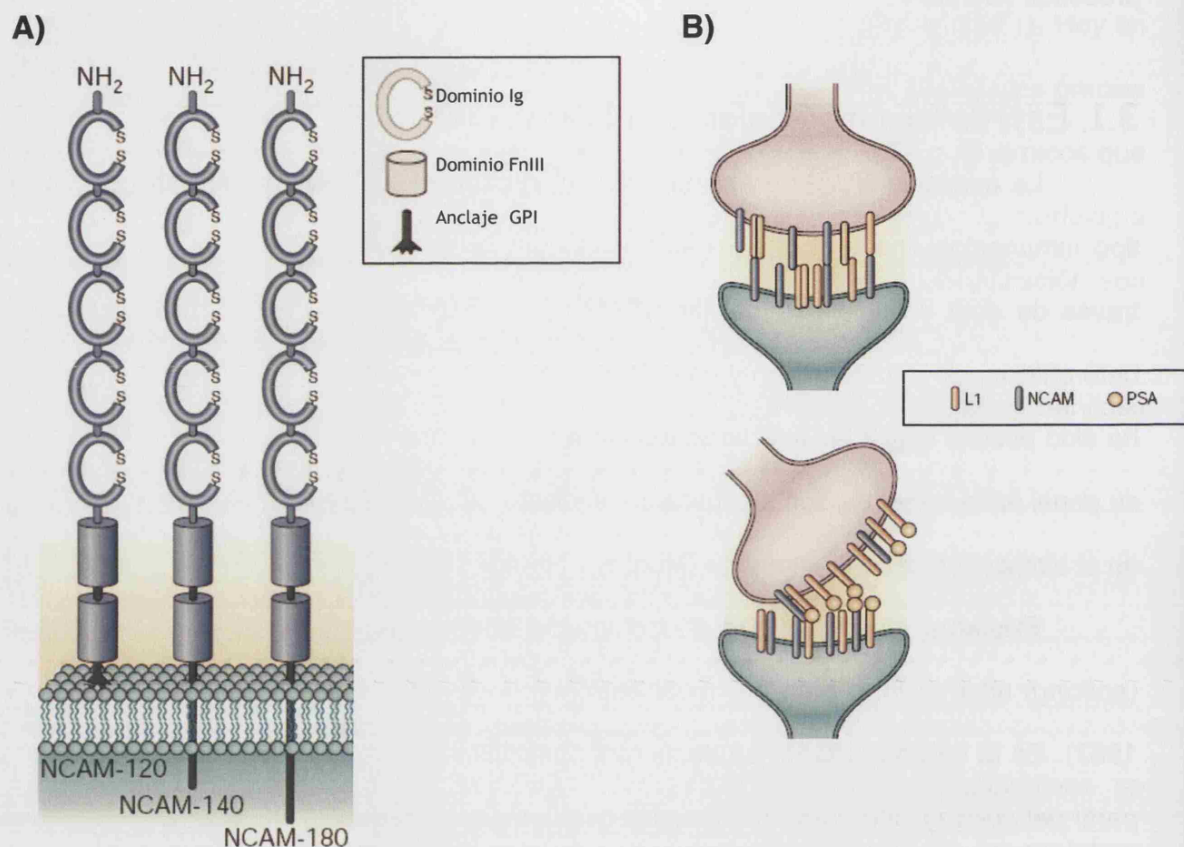


Figura 3. A) Estructura de NCAM y sus isoformas, B) Función del PSA como separadora de las moléculas de NCAM. Adaptado de Sandi, 2004.

En el líquido cefalorraquídeo y en el plasma sanguíneo están presentes otras isoformas solubles de NCAM (NCAMs 1, 2 y 3), normalmente asociadas a lípidos (Ronn y cols, 1998). La más abundante de estas isoformas proviene de la proteólisis de la región extracelular de NCAM 120 por la acción de una fosfolipasa (Bock y cols, 1987; Olsen y cols, 1993).

Una particular e interesante característica bioquímica de NCAM es su capacidad para unir largas cadenas lineales de homopolímeros de α 2,8-ácido polisialílico (PSA) al módulo Ig5. Una única cadena de PSA puede consistir en más de 50 monómeros, pero dicha longitud puede variar substancialmente (Rougon, 1993). Se piensa que la larga

cadena de PSA, cargada negativamente, podía funcionar como un espaciador que reduciría la fuerza de las interacciones tanto homofílicas como heterofílicas que se producen entre moléculas de NCAM (ver Figura 3) (Hoffman y Edelman, 1983; Rougon, 1993). Este proceso podría estar relacionado con la facilitación de la reorganización que ocurre durante el desarrollo del cerebro y bajo condiciones de plasticidad sináptica en el adulto. De hecho, el patrón de expresión de PSA-NCAM durante el desarrollo del sistema nervioso central es muy dinámico y generalizado, participando de forma esencial en la guía axonal o la formación del músculo esquelético (Rutishauser y Landmesser, 1996). En el cerebro adulto, sin embargo, el PSA está prácticamente ausente y su expresión queda limitada a aquellas regiones cerebrales caracterizadas por su elevada tasa de plasticidad sináptica. Así, se ha constatado que existe una gran expresión de PSA-NCAM en el bulbo olfativo, donde se produce continuamente regeneración neural (Kaplan y Hinds, 1977); en el giro dentado del hipocampo maduro participando en procesos de remodelación sináptica (Rutishauser y Landmesser, 1996); en el hipotálamo, donde se producen cambios en el número de sinapsis regulados por hormonas (Hatton, 1997); en la corteza piriforme y otras regiones neocorticales (Seki y Arai, 1991) como en la corteza prefrontal (Varea y cols, 2005).

3.2. Funciones de NCAM

La fuerza de adhesión de una neurona que expresa NCAM depende, sobre todo, de la expresión de los diversos ligandos de NCAM así como del estado de glicosilación que exprese (Ronn y cols, 1998).

- La función clásica de NCAM es mediar la adhesión celular a través de una acción homofílica, lo que parece estar mediado por una interacción recíproca a través del tercer dominio Ig de las NCAM de membranas opuestas (Rao y cols, 1994).
- Durante el desarrollo, las moléculas de PSA-NCAM participan en la remodelación estructural disminuyendo la adhesión celular mediada por NCAM y L1, lo cual se plantea es un requisito necesario para la formación de las nuevas conexiones neuronales que se producen en el cerebro en desarrollo (Edelman y Crossin,

- 1991;Ronn y cols, 1998). En este periodo, la expresión de PSA-NCAM correlaciona en tiempo y espacio con el crecimiento axonal, la formación de bifurcaciones axonales y de contactos celulares en los sistemas corticoespinal (Daston y cols, 1996) y retinotectal (Williams y Barclay, 1988), así como en la formación de las uniones neuromusculares (Tang y cols, 1994).
- Por otra parte, NCAM-140 se ha visto implicada en el crecimiento de expansión de las neuritas a través de la activación de diferentes vías de transducción (Kolkova y cols, 2000). Se ha propuesto que la activación de señales intracelulares por parte de NCAM se produzca a través de la unión con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-R, del inglés *fibroblast growth factor receptor*) (Saffell y cols, 1997;Niethammer y cols, 2002), a través del denominado dominio homólogo con CAM (CHD, del inglés *CAM-homology domain*), lugar donde también se uniría L1 y la N-cadherina (Doherty y Walsh, 1996). Esta isoforma de NCAM también parece estar implicada en la activación del factor NF-κB en astrocitos (Little y cols, 2001).
 - *In vitro* se ha comprobado que la aplicación de anticuerpos frente a NCAM inhibe la generación de la LTP en la región CA1 del hipocampo (Ronn y cols, 1995).

3.3. Mecanismos de señalización de NCAM

NCAM puede interaccionar con algunos receptores para factores de crecimiento, los cuales median los mecanismos moleculares intracelulares que permiten el crecimiento de las neuritas, entre ellos:

- Receptor para el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF-R, del inglés *glial cell derived neurotrophic factor receptor*) (Paratcha y cols, 2003)
- Receptor para el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF-R, del inglés *brain derived neurotrophic factor receptor*) (Muller y cols, 2000).
- Receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-R) (Doherty y Walsh, 1996).

Otra vía activada por NCAM se lleva a cabo por su interacción con tirosina-quinasas intracelulares, *p59Fyn* y las kinasas de adhesión focal (FAK), comprobándose que al

menos la interacción con las tirosina-kinasas está asociada con los procesos de crecimiento de neuritas (Beggs y cols, 1994). También parece existir una relación entre el incremento de la expresión de NCAM-180, la activación del receptor de tipo NMDA y la sinaptogénesis (Hoffman y cols, 1998;Dityatev y cols, 2004).

3.4. FGL, un péptido mimético de NCAM

Tras un anclaje homofílico, NCAM promueve el crecimiento de las neuritas a través de mecanismos que incluyen la interacción con el FGF-R, el cual pertenece a la familia de los receptores de tipo tirosina-kinasa (Saffell y cols, 1997). Esta unión se realiza entre dos módulos FnIII de NCAM y los módulos D2 y D3 tipo inmunoglobulina del receptor, llamados *FG loop* o FGL (Doherty y Walsh, 1996). La activación del receptor induce a su vez la de la fosfolipasa-C γ (PC γ), que genera dos segundos mensajeros, el IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) y el DAG (diacilglicerol). El IP3, favorece la entrada de calcio en la célula a partir de los reservorios intracelulares (Kolkova y cols, 2000) y el DAG activa a la proteína kinasa C (PKC) la cual activa canales de calcio dependientes de voltaje y activa otra serie de rutas intracelulares (Williams y cols, 1994). En parte vía FGF-R, las NCAM también activan la cascada de las proteínas kinasas activadoras de mitógenos (MAPK), donde participan Raf, MEK1/2 y las kinasas reguladoras de la señal extracelular 1 y 2 (Erk1/2) (Schmid y cols, 1999;Kolkova y cols, 2000;Jessen y cols, 2001).

En el laboratorio de la Dra E. Bock, en la Universidad de Dinamarca, se sintetizó un péptido sintético análogo al péptido *FG loop* que representa una parte del sitio de anclaje de NCAM al receptor FGF-R de tipo 1 (Kiselyov y cols, 2003), y que se denominó también FGL.

Se ha comprobado que la utilización de este péptido FGL mimético de NCAM favorece el establecimiento de varios tipos de memoria (Cambon y cols, 2004), lo que apoya la teoría de que las interacciones NCAM-FGF-R1 modulan críticamente la fuerza con la que se almacena la información aprendida. El hecho de que las inyecciones intracerebroventriculares de FGL inmediatamente después del entrenamiento en dos pruebas dependientes de hipocampo (condicionamiento del miedo al contexto y laberinto

acuático de Morris) produjeran una memoria duradera en el tiempo (hasta el día 14 en el laberinto acuático de Morris y hasta el día 28 en el condicionamiento del miedo al contexto) parece indicar que el hipocampo pudiera ser una estructura diana para este péptido. Sin embargo, no se puede descartar que el FGL pueda actuar también sobre otras áreas cerebrales, dado que también potencia la memoria en el condicionamiento del miedo al tono, una prueba independiente de la función hipocampal y que depende de manera crítica de la amígdala (Cambon y cols, 2004). Recientemente, se ha comprobado que la administración del péptido FGL también parece favorecer la retención a largo plazo de la memoria social (Secher y cols, 2006).

La acción facilitadora del FGL sobre el almacenamiento de información podría deberse a que el péptido estaría afectando a las cascadas de señales moleculares resultantes del entrenamiento (Bontempi y cols, 1999), e incluso podría afectar a los procesos estructurales que regulan la persistencia de la memoria en el tiempo (Dudai, 2002).

Al exponer cultivos de neuronas hipocampales a FGL por un tiempo entre 1 y 48 horas se facilita la liberación de neurotransmisores desde el terminal sináptico en respuesta a despolarización presináptica (Skibo y cols, 2005). Además, el FGL favorece la formación de sinapsis *in vitro*; de hecho, se piensa que la facilitación de la memoria a largo plazo inducida por el FGL podría estar mediada por la capacidad del péptido (vía activación del FGF-R1) de incrementar la función presináptica o bien la formación de sinapsis o ambas (Cambon y cols, 2004). Cuando se evaluó el efecto neuroprotector del FGL en neuronas cerebelares, hipocampales y neuronas dopaminérgicas en cultivo expuestas a diferentes factores neurotóxicos, se comprobó que el péptido era capaz de incrementar la supervivencia neuronal e incluso reducir la fragmentación del ADN que resulta del proceso de apoptosis (Neiiendam y cols, 2004).

Recientemente, Klementiev y colaboradores (Klementiev y cols, 2007) han comprobado que la administración de FGL a ratas tratadas con el péptido A β -₂₅₋₃₅, tanto antes de la aparición de signos aparentes relacionados con la enfermedad de Alzheimer (EA) como una vez que éstos se han manifestado, es capaz de prevenir y de revertir las

alteraciones tanto neuronales como cognitivas desarrolladas por los animales, lo que podría suponer un primer paso importante en el tratamiento de la neuropatología asociada a la EA así como a la demencia.

FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS

Los miembros de la familia del FGF que se expresan en el SNC participan de forma importante en el desarrollo y en procesos de reparación (para revisión ver (Reuss y Bohlen und, 2003).

Tras el aislamiento y clonación del primer FGF, el FGF-2, se han encontrado hasta 23 tipos de FGF y 4 receptores (Abraham y cols, 1986; Powers y cols, 2000). En el SNC se localizan al menos 10 de estos ligandos de los cuales, a excepción del FGF-1 y del FGF-2, no se conocen en profundidad sus funciones (Reuss y Bohlen und, 2003).

Las principales funciones de los FGFs en el SNC son: neurogénesis, diferenciación celular, crecimiento axonal y supervivencia neuronal, siendo además fundamentales en procesos de reparación tras distintos tipos de lesiones nerviosas tanto periféricas como centrales y en enfermedades degenerativas (Mocchetti y Wrathall, 1995; Haynes y cols, 2007). En el cerebro adulto también se ha comprobado su participación en procesos cognitivos que incluyen el aprendizaje y la memoria (Calamandrei y Alleva, 1995).

4. Aprendizaje y memoria

Tanto para los humanos como para el resto de los animales, la capacidad de retener las experiencias pasadas es esencial para poder adaptarse mejor a los eventos del futuro. Se define **aprendizaje** como el proceso por el cual se adquiere nueva información y **memoria** como la persistencia de dicha información, a la cual puede accederse posteriormente mediante su evocación o recuerdo (Squire, 1987).

A partir del estudio de pacientes con lesiones cerebrales se fueron estableciendo los fundamentos de la organización biológica de la memoria humana, ya que en muchas situaciones dichas lesiones produjeron alteraciones que proporcionaron las pistas sobre

las regiones cerebrales que subyacen a los procesos de la memoria. La utilización de diferentes técnicas y sujetos de experimentación han puesto de manifiesto que la memoria refleja varios procesos, dependientes entre si, que incluyen la adquisición de información, su consolidación, la retención durante un periodo de tiempo variable, el recuerdo y a veces su olvido. Existen diferentes formas de clasificar la memoria, en función del tipo de información almacenada y en función del tiempo en que la información queda almacenada (Goelet y cols, 1986).

■ **En función del tipo de información almacenada, la memoria se clasifica en:**

- MEMORIA EXPLÍCITA o DECLARATIVA: recolección de los acontecimientos biográficos y del conocimiento de hechos. Requiere del esfuerzo consciente e intencional para ser recordada o bien puede ser evocada por el contacto con algún estímulo.
- MEMORIA IMPLÍCITA: no depende de la consciencia ni del procesamiento cognitivo para que los hechos sean adquiridos o recordados (Graf y Schacter, 1985). Normalmente se establece de forma progresiva tras la repetición de sus elementos.

■ **En función de la duración de la información almacenada:**

- MEMORIA A CORTO PLAZO: La entrada de información procedente de nuestros sentidos es procesada por el cerebro en fracciones de segundo, y si se estima que no es lo suficientemente importante, tanto consciente como inconscientemente, esta entrada es almacenada en forma de memoria a corto plazo. Dentro de este tipo de memoria puede encontrarse la memoria de trabajo, que puede durar de segundos a minutos y nos permite realizar una tarea cognitiva compleja utilizando varias herramientas cerebrales distintas al mismo tiempo.
- MEMORIA A LARGO PLAZO: permiten el recuerdo de hechos y eventos específicos, el reconocimiento de otros sujetos y el uso de herramientas cognitivas necesarias para la ejecución de diversas tareas, la cuales son retenidas por largos periodos de tiempo, y más si son recordados periódicamente.

Una cuestión que ha sido debatida durante mucho tiempo es si la memoria a corto

plazo y la memoria de trabajo son simplemente fases de la memoria a largo plazo o son tipos de memoria independiente. Se ha visto que no todas las memorias a corto plazo se llegan a consolidar como memorias a largo plazo (Robertson, 2002). La consolidación de la memoria es un proceso que ha estudiado en diversas especies (Alloway y Routtenberg, 1967; Sandi y Rose, 1994b) y depende de la síntesis de nuevas proteínas, viéndose afectada tanto por el tratamiento con diferentes fármacos (Izquierdo y McGaugh, 2000; Del Olmo y cols, 2007), como por inhibidores de la síntesis proteica (Goelet y cols, 1986). Pero el cerebro no almacena memorias completas, sino partes de la información que, posteriormente, pueden ser usadas para crear los recuerdos. Diferentes regiones cerebrales participan en la codificación, almacenamiento y recuerdo de las experiencias particulares, eventos, hechos y herramientas mnemónicas. El estudio en animales de investigación de la actividad de neuronas aisladas o grupos de neuronas durante las diferentes fases del aprendizaje y la memoria ha permitido definir distintos patrones de actividad cerebral que cambian en cada momento cuando el cerebro reacciona a los estímulos y ejecuta las respuestas aprendidas. Hoy en día, técnicas como la resonancia magnética funcional (RMf) y la tomografía por emisión de positrones (TEP) permiten estudiar tanto la actividad metabólica, como el flujo sanguíneo cerebral durante el desarrollo de pruebas de aprendizaje y memoria (Robertson, 2002).

Aquellas experiencias que llevan consigo una determinada carga emocional son, por lo general, mejor recordadas que las consideradas neutras (McGaugh y cols, 1975). Las hormonas adrenales liberadas durante el estrés y situaciones emocionales, los glucocorticoides y la adrenalina, juegan un papel crítico tanto en la importancia que se va a atribuir a dicha situación, como en la fuerza con la que se va a almacenar la información. Es más, tanto la administración de dichos ligandos de forma exógena, como el tratamiento con drogas que actúan sobre estos sistemas, pueden modular las memorias emocionales (Sandi y Rose, 1994b; Lupien y McEwen, 1997).

Los numerosos resultados obtenidos en este área permiten pensar que el control de los procesos de aprendizaje y memoria están sujetos al funcionamiento de diferentes sistemas neurales (Packard y Knowlton, 2002; Gold, 2003). Si bien está ampliamente

documentado que las lesiones hipocampales afectan a distintas pruebas de aprendizaje y memoria (McDonald y White, 1995; Ferbinteanu y McDonald, 2001).

4.1. Plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria

Durante el aprendizaje tienen lugar cambios fisiológicos reversibles en la transmisión sináptica en el sistema nervioso central, y dichos cambios deben ser estabilizados o consolidados para que dicha memoria persista en el tiempo (McGaugh, 2002).

Fueron Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1894) y Sherrington (Sherrington, 1906) los primeros científicos en aportar una hipótesis acerca de la formación y mantenimiento de la memoria, indicando que el aprendizaje posiblemente alteraba las conexiones entre neuronas. Basándose en estas primeras hipótesis, el psicobiólogo canadiense Donald Hebb propuso, en 1949, la hipótesis de que la memoria debía estar asentada en cambios estructurales permanentes del cerebro que estarían basados, a su vez, en modificaciones en la efectividad de las sinapsis existentes (Hebb, 1949). Según Hebb, estos cambios se producirían gracias a la activación repetida de una sinapsis y a un fortalecimiento de la relación entre las neuronas pre y postsinápticas, lo cual aumentaría la eficacia de la comunicación entre ambas. Hoy en día, se acepta el concepto de **plasticidad neural**, que hace referencia a las propiedades plásticas de las neuronas por las que tienen la capacidad de modificar su estructura o naturaleza química en respuesta a diferentes condiciones vitales, y que se postula que sustentan los procesos de aprendizaje y memoria. Los cambios temporales y reversibles estarían relacionados con la memoria a corto plazo, mientras que los cambios duraderos y estables se referirían a la memoria a largo plazo, y requieren expresión génica y la síntesis de nuevas proteínas (Kandel, 2001).

Se han propuesto distintos mecanismos moleculares que subyacerían a dicha plasticidad neural siendo los más importantes:

1. **LTP** (potenciación de larga duración, del inglés *long term potentiation*): consiste en el aumento de la eficacia sináptica como consecuencia de una estimulación breve, pero de alta frecuencia. Aunque primero se describió en el hipocampo (Bliss y Lomo, 1973),

área en la que este fenómeno ha sido estudiado en mayor profundidad, posteriormente se ha descrito también en otras áreas cerebrales, como la amígdala (Clugnet y LeDoux, 1990) y la corteza prefrontal (Clugnet y LeDoux, 1990; Hirsch y Crepel, 1990) entre otras. La gran cantidad de glutamato liberado por parte de la neurona presináptica provoca cambios en la sinapsis que comienzan con un gran aumento de la concentración de calcio en el terminal postsináptico. Estos cambios afectan tanto a la neurona presináptica (debido a la liberación de neurotransmisores retrógrados, como el óxido nítrico y el monóxido de carbono), como a la neurona postsináptica, en la que aumenta la capacidad de respuesta de los receptores glutamatérgicos, el número de los mismos en la sinapsis etc., mediante mecanismos moleculares complejos. Todo esto se resume en un aumento de la eficacia de dicha sinapsis e incluso en la formación de otras nuevas (Bliss y Lomo, 1973; Chen y Tonegawa, 1997).

2. **LTD** (depresión de larga duración, del inglés *long term depression*): es una forma de plasticidad sináptica caracterizada por un descenso en la eficacia de la sinapsis y que está provocada por una estimulación de baja intensidad. En ella participan los mismos elementos moleculares que en la LTP pero, en este caso, dan lugar a aumento leve de la concentración de calcio en el interior del terminal postsináptico que va a desencadenar los eventos contrarios (Ito, 1989).

La mayoría de las sinapsis excitatorias en el cerebro contienen, como elementos morfológicos, las denominadas **espinas dendríticas** (Nimchinsky y cols, 2002). Se trata de perturbaciones especializadas en las dendritas que contienen receptores, canales y moléculas señal que unen la actividad sináptica con la bioquímica postsináptica (Sheng y Kim, 2002). Así, las espinas actúan como compartimentos cerrados que permiten cambios rápidos en la concentración de las moléculas señal, como el calcio, y así hacen posible una respuesta eficiente ante la llegada de un nuevo estímulo. La modulación en el número y/o la morfología de las espinas dendríticas se ha propuesto que contribuye a las alteraciones que se producen en la transmisión sináptica durante el aprendizaje (Nimchinsky y cols, 2002). La formación de nuevos contactos sinápticos es un proceso

dinámico que conlleva alteraciones morfológicas, así como la modulación de la adhesión entre las neuronas pre y postsináptica (Benson y cols, 2000). Dichos procesos requieren de la actividad coordinada entre moléculas que regulan la reorganización del citoesqueleto celular y la morfología, así como entre aquellas que controlan la adhesión entre las membranas neuronales. De esta forma, las moléculas de adhesión celular no sólo estarían contribuyendo a la estabilización de la conectividad entre neuronas, sino que también jugarían un papel primordial en la formación y estabilización de la LTP, procesos que se plantean como la base de la consolidación de la memoria (Lamprecht y LeDoux, 2004).

4.2. Implicación de la adrenalina en el aprendizaje y la memoria

La adrenalina es una de las hormonas moduladoras de la memoria más importantes. Las pruebas de su capacidad para mejorar la memoria se han obtenido no sólo de experimentos con roedores sino también con humanos y en un amplio abanico de pruebas. Algunas pruebas utilizadas con roedores han sido la evitación pasiva (Sternberg y cols, 1985; Introini-Collison y McGaugh, 1986), la evitación activa (Torras-Garcia y cols, 1998) y la alternancia espontánea (Talley y cols, 2000); y en humanos se ha visto que la adrenalina incrementa la memoria de trabajo visual (Cahill y Alkire, 2003).

La adrenalina no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), pero modula la consolidación de la memoria activando los receptores β -adrenérgicos periféricos localizados en las proyecciones del nervio vago que llegan hasta el núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral (Axelrod, 1959; Hassert y cols, 2004).

La activación de la amígdala es crítica en la modulación que la adrenalina ejerce sobre la consolidación de la memoria. Se ha comprobado que la infusión de antagonistas β -adrenérgicos en la amígdala tras un entrenamiento bloquea los efectos potenciadores de la adrenalina, mientras que la utilización de agonistas incrementa la memoria en una prueba de evitación inhibitoria (Liang y cols, 1986). En concreto, es el NBLA el objetivo principal de la adrenalina. Los efectos moduladores de la memoria de las drogas que actúan sobre este sistema podrían deberse a su acción sobre otros sistemas, como el GABAérgico y el sistema opioide endógeno (McGaugh, 1966), así como a la acción sobre

la liberación de NA dentro de la amígdala (Hatfield y cols, 1999).

IMPLICACIÓN DE LA GLUCOSA EN LA MEMORIA

Una de las acciones de la adrenalina es incrementar los niveles de glucosa en sangre, la cual puede atravesar la BHE y regular la memoria. Tanto la administración periférica de adrenalina como de glucosa incrementan el aprendizaje y la memoria en ratas y ratones: pruebas de condicionamiento operante (Messier y Destrade, 1988; Benton y Nabb, 2003), pruebas de reconocimiento de objetos y de discriminación visual (Messier, 1997; Hughes, 2003), prueba de alternancia espontánea (Ragozzino y cols, 1996; Ragozzino y cols, 1998; Talley y cols, 2000); así como en humanos en pruebas de memoria verbales básicas (Korol, 2002; Benton y Nabb, 2003; Messier, 2004; Watson y Craft, 2004). También la administración directa de glucosa en el cerebro incrementa el aprendizaje y la memoria (McNay y Gold, 2002). Se ha comprobado que la adrenalina no es capaz de favorecer la memoria si se bloquea el incremento de glucosa en sangre tanto en un protocolo de alternancia espontánea como de evitación pasiva (Gold y cols, 1986; Talley y cols, 2000). Todos estos hallazgos parecen indicar que el incremento del nivel de glucosa circulante tras la liberación de adrenalina, media, al menos en parte, los efectos de la propia adrenalina sobre el aprendizaje y la memoria. Los niveles de glucosa extracelular en el hipocampo son sensibles a la ejecución de pruebas conductuales, como la alternancia espontánea, así como a la inyección sistémica de glucosa a dosis que incrementan el aprendizaje (McNay y cols, 2000).

Alguno de los mecanismos moleculares implicados en la acción de la glucosa sobre el aprendizaje y la memoria son: su acción bloqueante de los canales de potasio-ATP (Stefani y cols, 1999; Rashidy-Pour, 2001) y la liberación de acetilcolina en el cerebro durante las tareas de aprendizaje y memoria (Ragozzino y cols, 1996) de forma selectiva en áreas que participan en la tarea que se está realizando (Gold, 2004).

4.3. Implicación de los glucocorticoides en el aprendizaje y la memoria

Existen numerosos experimentos realizados tanto con animales como con humanos, en los que se pone de manifiesto el papel fundamental de las catecolaminas y los glucocorticoides secretados durante una situación estresante sobre el aprendizaje y la memoria (McGaugh y cols, 1996; Lupien y McEwen, 1997; de Kloet y cols, 1999; Roozendaal, 2000; Sandi, 2003).

■ Implicación de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria

El efecto facilitador de los glucocorticoides sobre la memoria sigue un patrón de dosis-respuesta en forma de U invertida, es decir, dosis moderadas favorecen la consolidación de la memoria mientras que dosis altas no tienen efecto o incluso pueden ser perjudiciales. Se ha podido comprobar este fenómeno utilizando diversos paradigmas de aprendizaje, como con la prueba de evitación pasiva (Sandi y Rose, 1997; Roozendaal y cols, 1999), la prueba de condicionamiento del miedo (Pugh y cols, 1997; Hui y cols, 2004) y el aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático (Sandi y cols, 1997). Este efecto facilitador se produce en una ventana de tiempo limitada tras el entrenamiento de forma que, si se administran horas más tarde del mismo, son ineficaces (Flood y cols, 1978; Sandi y Rose, 1994a). Pero también es posible alterar los procesos de memoria de forma negativa mediante la exposición a los sujetos de un estrés severo o bien mediante la administración de glucocorticoides antes de una prueba de retención (de Quervain y cols, 1998; de Quervain y cols, 2000).

La elevada densidad de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo lo sitúa como estructura principalmente involucrada en mediar la influencia de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria (Lupien y McEwen, 1997) y los procesos de plasticidad neural (Foy y cols, 1987; Diamond y cols, 1992; Korz y Frey, 2003). Esta idea se ha constatado por experimentos en los que se ha visto que la administración post-entrenamiento del agonista de GRs RU2862 en el hipocampo dorsal favorece la retención en la prueba de evitación inhibitoria, mientras que la infusión antes del entrenamiento del antagonista RU38486 dificulta el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris

(Roozendaal y McGaugh, 1997). También se ha comprobado que los animales adrenalectomizados presentan dificultades para consolidar memorias asociadas a situaciones emocionales (Borrell y cols, 1983;Oitzl y de Kloet, 1992;Roozendaal y cols, 1996), lo cual puede revertirse administrando dexametasona, un corticoide sintético (Roozendaal y cols, 1996). Además, se puede favorecer la consolidación de las nuevas memorias adquiridas mediante el tratamiento con glucocorticoides tras el entrenamiento (Borrell y cols, 1983;Oitzl y de Kloet, 1992;Sandi y Rose, 1994b;Sandi y cols, 1997;Cordero y Sandi, 1998;Buchanan y Lovallo, 2001).

Tanto los efectos potenciadores como deletéreos de los glucocorticoides sobre el aprendizaje y la memoria se deben a su acción sobre los receptores de glucocorticoides, principalmente sobre los de tipo II o GR (Sandi y Rose, 1994a;Conrad y cols, 1999b), ya que la administración de un antagonista de dicho subtipo antes o después del entrenamiento en el laberinto acuático produce un déficit en la prueba de memoria a las 24 horas (Oitzl y de Kloet, 1992). Más aún, se ha observado que los ratones con una mutación en el gen para GR que altera la unión de GR al ADN muestran alteraciones en la consolidación de la memoria espacial (Oitzl y cols, 2001). Además, la administración de un antagonista de los GR, pero no de los MR, antes del entrenamiento del condicionamiento del miedo al contexto, el cual depende de la función hipocampal, induce una disminución en el tiempo de inmovilización durante la prueba de memoria (Cordero y Sandi, 1998). Aunque los receptores tipo MR también participan en el aprendizaje, éstos parecen estar más implicados en los patrones de búsqueda de los animales, así como en la reactividad emocional ante situaciones novedosas (Oitzl y cols, 1994;Sandi y Rose, 1994a). Berger y colaboradores (Berger y cols, 2006), utilizando un modelo murino, vieron que al inactivar los receptores de tipo MR se alteraba el aprendizaje espacial evaluado en el LAM sin afectar a la ansiedad de los animales.

Dentro las diferentes estructuras que participan en la consolidación de la memoria, la amígdala es otro componente esencial ya que media tanto los efectos de los glucocorticoides como de la adrenalina sobre este proceso (McGaugh, 2000;McGaugh, 2004). El núcleo basolateral de la amígdala (NBLA) parece modular la consolidación de la

memoria mediada por el hipocampo. De hecho se ha visto que las lesiones en el NBLA bloquean la LTP en el giro dentado (GD) del hipocampo, y que, al contrario, la estimulación del NBLA incrementa la LTP en el mismo área (Ikegaya y cols, 1994;Ikegaya y cols, 1995;Ikegaya y cols, 1997;Escobar y cols, 1998;Akirav y Richter-Levin, 1999;Frey y cols, 2001;Akirav y Richter-Levin, 2002;Nakao y cols, 2004). Los efectos potenciadores de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria dependen a su vez del sistema noradrenérgico amigdalino. Utilizando la prueba de evitación inhibitoria, diversos experimentos han demostrado que la actividad noradrenérgica dentro del NBLA está relacionada con la fuerza de la consolidación de la memoria (Ferry y cols, 1999;Hatfield y McGaugh, 1999). Además, es la amígdala la estructura que parece jugar un papel mayor cuando la situación conlleva un alto nivel de estrés (LeDoux, 1992;Cahill y McGaugh, 1998). En un estudio realizado con agua fría (situación estresante) y caliente (situación no estresante) en el LAM, se comprobó que en agua fría las ratas que aprendían correctamente tenían activado tanto del hipocampo como la amígdala; sin embargo, los animales que no realizaron correctamente la prueba así como aquellos que nadaron en agua caliente únicamente mostraron tener activo el hipocampo (Akirav y cols, 2001).

■ Implicación de los glucocorticoides en la recuperación de los recuerdos

Los glucocorticoides, así como la exposición a situaciones estresantes tras el aprendizaje de una tarea, impiden la retención de la misma cuando se evalúa 30 o 60 minutos después (Diamond y cols, 1999;Okuda y cols, 2004), cuando la traza de memoria no se ha consolidado aún en forma de memoria a largo plazo. Si se administran inmediatamente antes de la prueba de memoria (24 horas después del entrenamiento) se produce una alteración temporal de la ejecución de la misma (de Quervain y cols, 1998;Roosendaal, 2003;Roosendaal y cols, 2004). Sin embargo, no se observa el mismo efecto cuando la prueba de memoria se realiza inmediatamente después del entrenamiento, lo que indica que los glucocorticoides estarían alterando principalmente el recuerdo de las memorias a largo plazo ya consolidadas, de manera similar a lo que se ha comprobado en humanos (de Quervain y cols, 2000;Roosendaal y cols, 2006).

Datos recientes, obtenidos mediante TEP en humanos, indican que la

administración de cortisona una hora antes de la prueba de retención reduce el flujo sanguíneo en el giro parahipocampal, lo que correlaciona con la alteración en el recuerdo en pruebas de memoria episódica (de Quervain y cols, 2003b).

■ Implicación de los glucocorticoides en la memoria de trabajo

Tanto la administración de glucocorticoides, como la exposición a situaciones estresantes bloquea profundamente la memoria de trabajo (Arnsten y Goldman-Rakic, 1998) en la que está implicada la integridad de la CPFm (Fuster, 1991). Un nivel de estrés moderado altera la ejecución de la prueba de alternancia demorada en roedores, la cual se utiliza para evaluar este tipo de memoria (Murphy y cols, 1996a). Esta prueba también se ve perjudicada tras la inyección sistémica de corticosterona o la administración en la CPFm del agonista de GR RU28362 (Roozendaal y cols, 2004). En humanos ocurre lo mismo, la administración de cortisol dificulta la memoria de trabajo (Lupien y cols, 1999; Young y cols, 1999). Al parecer, esta acción de los glucocorticoides se lleva a cabo gracias a su efecto activante de la neurotransmisión noradrenérgica durante situaciones de alerta o con cierto contenido emocional (Roozendaal y cols, 2004).

Por otro lado, son numerosos los datos que evidencian el efecto negativo del estrés crónico o niveles elevados y continuados de glucocorticoides sobre el aprendizaje y la memoria (Newcomer y cols, 1994; Bodnoff y cols, 1995; Conrad y cols, 1996; Park y cols, 2001; Venero y cols, 2002). Es más, se ha visto que dichas alteraciones pueden tener efectos deletéreos sobre el cerebro y sobre la conducta mucho tiempo después (Sandi y Touyarot, 2006). Se ha postulado que el daño cognitivo producido por el estrés crónico podría basarse en cambios neuronales, tales como la atrofia de las dendritas apicales de las células piramidales de la regiones CA1 y CA3 del hipocampo (McEwen y Magarinos, 1997; Stewart y cols, 2005), aumento en la tasa de muerte en el hipocampo (Sapolsky y cols, 1986; Sapolsky, 1990; McEwen y Magarinos, 1997; Stewart y cols, 2005) y una reducción de la neurogénesis en el GD del hipocampo (Gould y cols, 1998; Czeh y cols, 2001). Estas anomalías estructurales no son específicas del hipocampo y algunas de ellas

pueden producirse en otras áreas cerebrales, como la CPF (Wellman, 2001; Cook y Wellman, 2004).

4.4. Implicación de NCAM en el aprendizaje y la memoria

La participación de NCAM en procesos de sinaptogénesis y plasticidad sináptica, así como la modulación de su expresión *in vivo* tras la ejecución de tareas de aprendizaje, hacen de ella una buena candidata para participar en la consolidación de la información aprendida (Fields y Itoh, 1996).

La mayoría de los estudios se han centrado en la expresión de NCAM en el hipocampo, debido a que esta estructura se encuentra relacionada con muchas de las pruebas de aprendizaje realizadas con roedores (Ambrogio Lorenzini y cols, 1999). Además, el hipocampo es una de las pocas regiones cerebrales en las que hay neurogénesis en el adulto y en donde la expresión de PSA-NCAM permanece elevada tras el desarrollo, fundamentalmente en el giro dentado (Seki y Arai, 1991).

Años de estudio utilizando estrategias farmacológicas y de modificación genética han revelado que la implicación de las NCAMs y del grado de polisialización de las mismas en el aprendizaje y la memoria son dependientes de una ventana de tiempo específica. Los primeros experimentos demostraron que la administración intracerebroventricular de anticuerpos frente a NCAM tras el entrenamiento en el paradigma de evitación pasiva bloqueaba el aprendizaje siempre y cuando se hiciera entre 4 y 8 después, pero no inmediatamente (Doyle y cols, 1992b). Posteriormente, estos datos se confirmaron mediante la utilización del péptido sintético C3, capaz de unirse a la región Ig-I de NCAM e impedir su interacción, (Foley y cols, 2000; Cambon y cols, 2003) y anticuerpos frente a NCAM utilizando diferentes pruebas de aprendizaje y memoria (Roullet y cols, 1997; Cambon y cols, 2003). Las hipótesis que se han extraído de dichos resultados son que la primera fase de consolidación de la memoria inmediatamente tras el entrenamiento es independiente de NCAM (Scholey y cols, 1993), aunque si implica la participación de otras moléculas de la familia de las inmunoglobulinas como es L1 (Scholey y cols, 1995). Entre las 4 y las 8 horas tras el aprendizaje de una tarea, NCAM parece participar en los

procesos de remodelación sináptica en los que se asientan las bases de la memoria, ya sea modificando su adherencia o siendo sintetizada de nuevo para estabilizar las nuevas sinapsis formadas (Dityatev y cols, 2000).

La exposición a situaciones de estrés prolongado no sólo altera las capacidades de aprendizaje y memoria, sino que afecta a la expresión de NCAM en el hipocampo (Sandi y cols, 2001; Venero y cols, 2002; Sandi, 2004), alterando principalmente los niveles de la isoforma de 140 KDa (Touyarot y Sandi, 2002; Touyarot y cols, 2004).

Por otro lado, la expresión de PSA-NCAM en el hipocampo, corteza entorrinal y piriforme aumenta entre 10 y 12 horas tras el entrenamiento en diferentes pruebas:

- Evitación pasiva (Doyle y cols, 1992b; Doyle y Regan, 1993; Fox y cols, 1995; Foley y cols, 2003).
- Laberinto acuático (Murphy y cols, 1996b; Murphy y Regan, 1999; Foley y cols, 2003; Sandi, 2004; Van der Borght y cols, 2005; Venero y cols, 2006).
- Discriminación de olores (Foley y cols, 2003; Knafo y cols, 2005).
- Condicionamiento de miedo al contexto (Sandi y cols, 2003c; Lopez-Fernandez y cols, 2007).

La administración de la enzima endoneurominidasa (endoN), que evita la polisialización de NCAM, altera la memoria dependiente de hipocampo en el laberinto acuático de Morris (Becker y cols, 1996; Venero y cols, 2006). Puesto que un aumento de PSA-NCAM podría reducir la adhesión celular y estimular el crecimiento de neuritas, se postula que la polisialización de NCAM estaría favoreciendo la remodelación de las conexiones neuronales durante el establecimiento de las memorias a largo plazo (Regan y Fox, 1995).

Sin embargo, este fenómeno de polisialización asociado al aprendizaje parece ser a largo plazo, puesto que los niveles de PSA-NCAM permanecen elevados incluso 24 horas después del mismo (Doyle y cols, 1992a; Doyle y Regan, 1993; Regan y Fox, 1995; Fox y cols, 2000; Knafo y cols, 2005; Venero y cols, 2006). De hecho, en roedores, el tratamiento con anticuerpos frente a NCAM no altera la memoria hasta 48 después del aprendizaje (Doyle y cols, 1992a; Alexinsky y cols, 1997). En particular, el entrenamiento

en una gran variedad de pruebas de aprendizaje, incluido el laberinto acuático de Morris induce incrementos transitorios al cabo de 10-12h, en la frecuencia de neuronas que expresan NCAM-PSA en el límite infragranular del giro dentado (Sandi y cols, 2003b). Es más, la eliminación del PSA con EndoN dificulta la potenciación sináptica inducida por actividad y por la memoria espacial (Becker y cols, 1996). De hecho, que la modulación de PSA se produzca varias horas después del aprendizaje parece estar relacionado con la consolidación de la memoria a largo plazo (Murphy y Regan, 1998).

Un reciente estudio de Markram y colaboradores (Markram y cols, 2007b), ha encontrado que los ratones deficientes para PSA-NCAM presentan alterado su aprendizaje espacial en el laberinto acuático, mientras que la memoria no se ve afectada. Tampoco mostraron tener déficits en el aprendizaje y memoria en el condicionamiento del miedo al tono, lo que parece indicar que el PSA-NCAM no participa en los procesos sinápticos dependientes de la amígdala.

Estudios *in vitro*, utilizando rodajas de hipocampo, han demostrado que usando anticuerpos frente a NCAM se inhibe la LTP en la región CA1 del hipocampo a los pocos segundos de la estimulación de alta frecuencia que genera la LTP (Ronn y cols, 1995), indicando la posibilidad de que NCAM esté actuando durante, o inmediatamente después, de la fase de inducción de este fenómeno. Esta acción sería dependiente de la presencia de PSA, ya que la eliminación del mismo con endo-N también inhibe la inducción de la LTP (Becker y cols, 1996). Además, se ha comprobado que los niveles de NCAM extracelular aumentan de dos a tres horas después de la LTP, probablemente como consecuencia del incremento de la actividad proteolítica (Fazeli y cols, 1994). También se han observado cambios en la localización de NCAM en la membrana post-sináptica del GD en ratas adultas como consecuencia de la LTP (Fux y cols, 2003). Finalmente, en ratones mutantes que carecen del gen que codifica para NCAM no se puede inducir LTP ni en CA1 (Muller y cols, 1996; Muller y cols, 2000) ni en CA3 (Cremer y cols, 1998) hipocampal.

4.5. Pruebas de aprendizaje y memoria

4.5.1. Laberinto acuático de Morris

Posiblemente la prueba de aprendizaje espacial más utilizada con roedores de laboratorio es el laberinto acuático de Morris (LAM), desarrollado por Richard Morris para ratas y adaptado posteriormente para ratones (Morris y cols, 1982). En esta prueba, el animal es colocado en un tanque con agua cuya única escapatoria es una plataforma escondida justo debajo de la superficie de agua y siempre en el mismo punto en relación con la habitación y las claves que aparecen en las paredes de la misma. Por tanto, los sujetos deben aprender la localización espacial de la plataforma sumergida a partir del 'mapa espacial' de la habitación en donde son entrenadas que se forma en su cerebro. Existen evidencias de que la realización de este paradigma varía en función de la especie y la cepa utilizadas (D'Hooge y De Deyn, 2001), así como la edad (Frick y cols, 2000), el sexo (Frick y cols, 2000;Beiko y cols, 2004), el estrés (Perrot-Sinal y cols, 1996) y las variaciones en el procedimiento (Brandeis y cols, 1989). Los animales pueden utilizar diferentes estrategias para alcanzar la plataforma de escape durante una sesión de entrenamiento (Brandeis y cols, 1989). En la prueba de retención, la precisión espacial del animal se representa normalmente como el tiempo que pasa buscando la plataforma en el cuadrante en la que se encontraba durante las sesiones de aprendizaje (cuadrante diana) o el número de veces que atraviesa el área donde ésta había estado localizada (D'Hooge y De Deyn, 2001). Numerosos estudios han examinado a fondo el papel de algunas áreas cerebrales específicas en el aprendizaje en el laberinto de agua de Morris. Se han encontrado déficits en la realización de esta prueba en animales que tenían dañado el hipocampo, el estriado, el cerebelo y algunas áreas neocorticales. Lo que parece estar claro es que la integridad de la formación hipocampal es esencial para un buen aprendizaje espacial. Así, el laberinto acuático de Morris es un instrumento con una especial sensibilidad a los efectos de las lesiones en el hipocampo en rata (Morris, 1984) que ven dificultado su aprendizaje en esta prueba cuando la plataforma se encuentra escondida, pero no cuando es visible (D'Hooge y De Deyn, 2001).

4.5.2. Condicionamiento del miedo

Para el estudio exhaustivo de los procesos anatómicos y moleculares del miedo y de la ansiedad, la mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo utilizando el paradigma del condicionamiento clásico o Pavloviano. En esta prueba, los sujetos deben aprender rápidamente a asociar un estímulo *a priori* neutro (estímulo condicionado, EC), como puede ser un tono, una luz, un olor o incluso un contexto, con un estímulo aversivo (estímulo incondicionado, EI) que suele ser una descarga eléctrica. Este proceso crea una memoria a largo plazo, de manera que la reexposición al EC induce respuestas de miedo condicionadas, que incluyen respuestas autónomas (taquicardia, hipertensión, hipoalgesia), endocrinas, así como conductas defensivas específicas de la especie (inmovilización, valoración del riesgo, vuelo) (LeDoux, 2000). Esta prueba se puede utilizar con diversas especies, incluidos sujetos humanos. Tiene la ventaja de que es un paradigma rápido, fuerte, fácilmente evaluable y que permite un control preciso de los parámetros utilizados para modular la fuerza con que se establece la memoria (Stoppel y cols, 2006). Tanto los sistemas de neuromoduladores, como las hormonas de estrés, están fuertemente implicadas en la modulación de la fuerza con la que se consolida la memoria de miedo (McGaugh y Roozendaal, 2002; Sandi, 2004; McGaugh, 2004; Pezze y Feldon, 2004).

Existen muchos datos que implican a la amígdala en la modulación de este condicionamiento. Dentro de la amígdala, encontramos los siguientes núcleos implicados con dicha regulación (Hilton, 1969; Kaada y cols, 1971; Kapp y cols, 1978; LeDoux, 1992; Davis, 1992a; Sanders y Shekhar, 1995; Adolphs, 2002; Davis y Myers, 2002):

- Núcleo central de la amígdala (NCeA): este núcleo parece ser el sitio principal eferente de la amígdala en las respuestas de condicionamiento del miedo (Kapp y cols, 1994; LeDoux, 1998).
- Núcleo basolateral de la amígdala (NBLA): la interrupción de la función del NBLA inhibe tanto la adquisición del condicionamiento de miedo/respuestas afectivas negativas, como la recuperación de la información necesaria para la expresión de las emociones. De hecho, se ha propuesto que el NBLA actúa

como centro integrador y de relevo de la información sensorial y mnemónica necesaria para las respuestas de ansiedad (Campeau y Davis, 1995).

El tálamo y la corteza cerebral proyectan hacia la amígdala, donde la información es procesada en un complejo circuito amigdalino y enviada a la SGPA, tronco cerebral e hipotálamo, a través de los cuales se genera la respuesta fisiológica (LeDoux, 1998; Davis, 1998; Carrasco y Van de Kar, 2003). A pesar de que el papel de la amígdala en el control de la conducta relacionada con la expresión de la ansiedad y el miedo está bien documentada, existen algunos comportamientos de tipo aversivo que parecen ser independientes de la amígdala, como por ejemplo, la adaptación de la respuesta del eje HHA al estrés crónico (Carter y cols, 2004). Tanto el NBLA como el NLA se consideran el punto de conexión entre la información sensorial con distinto grado de procesamiento que llega desde el tálamo y las regiones corticales (Li y cols, 1996; Quirk y cols, 1997) y la información afectiva y nociceptiva (Shi y Davis, 1999). De hecho, se ha encontrado una potenciación de la actividad neural en el NLA de ratas condicionadas tanto *in vivo* como *in vitro* (McKernan y Shinnick-Gallagher, 1997). Además, se ha sugerido que hay proyecciones alternativas desde el tálamo hasta el NCeA (Paré y Gaudreau, 1996; Samson y Pare, 2005).

Sin embargo, se sabe que en el condicionamiento del miedo participan asociaciones espaciales (condicionamiento del miedo al contexto, CMC) o temporales (condicionamiento de traza, CMT) complejas, que requieren de la participación del hipocampo (Phillips y LeDoux, 1994; Anagnostaras y cols, 2001; Ahi y cols, 2004; Misane y cols, 2005). Esta conexión entre el hipocampo y la amígdala es, en parte, directa y recíproca (Pitkanen y cols, 2000). De hecho, el grado de sensibilización emocional implica diferentes grados de interacción amígdalo – hipocampal (Rudy y Pugh, 1996; Seidenbecher y cols, 2003).

4.5.3. Prueba de reconocimiento de objetos

De forma natural, los roedores tienden a aproximarse y explorar los objetos mostrando una preferencia innata por aquellos novedosos frente a los que les son familiares. La forma de investigarlos es tocando y oliendo los objetos, apoyándose sobre ellos e intentando manipularlos con las patas (Aggleton y cols, 1995). Esta conducta puede ser fácilmente registrada y cuantificada, y es una aproximación experimental sencilla para el estudio de la memoria de reconocimiento así como de la memoria episódica en roedores. Una gran ventaja sobre otras pruebas es que no requiere un aprendizaje espacial, privación de agua o comida o la aplicación de un estímulo reforzante (Dere y cols, 2007). De esta forma, no son necesarios elevados niveles de alerta ni induce estrés en el animal, por lo que se considera que está más próxima a las condiciones bajo las que se evalúa la memoria de reconocimiento en humanos (Ennaceur y Delacour, 1988).

Durante el entrenamiento las ratas se familiarizan con dos objetos idénticos situados en una arena a la que han sido previamente habituados. Tras un intervalo de tiempo variable, las ratas vuelven a la caja en donde se encuentran uno de los objetos ya conocidos y uno nuevo. En condiciones normales, los animales tienden a explorar más tiempo el objeto novedoso con respecto al ya conocido o familiar (Ennaceur y Delacour, 1988; Dix y Aggleton, 1999). En la prueba de reconocimiento de objetos (PRO) los intervalos de retención varían de minutos a horas, incluso días. Sin embargo las condiciones exactas para cada experimento deben ser evaluadas en función de los factores específicos del estudio, como la especie utilizada o incluso la cepa (Dere y cols, 2007).

Lesiones en el lóbulo temporal medial y específicamente en el hipocampo de humanos y primates dan lugar a alteraciones en la memoria de reconocimiento visual (Milner y McIntosh, 2005). El papel del hipocampo en la PRO ha sido ampliamente estudiada en roedores y con resultados en muchas ocasiones controvertidos. Ratas con el hipocampo lesionado han demostrado realizar correctamente la prueba hasta con 5 minutos de intervalo entre el entrenamiento y la evaluación de la memoria (Clark y cols, 2000; Mumby y cols, 2002). Sin embargo, con mayores intervalos de tiempo estas ratas

muestran déficits en comparación con los controles (Clark y cols, 2000).

4.5.4. Prueba de localización de objetos

En esta versión de paradigma de preferencia a la novedad las ratas deben reconocer que hay un objeto conocido en un lugar de la arena donde previamente no había ninguno. Si los animales recuerdan las posiciones de los objetos en la fase de entrenamiento, deben explorar más tiempo el objeto en la nueva localización que aquel que permanece en la misma posición (Ennaceur y cols, 1997;Dix y Aggleton, 1999). Esto sugiere que los roedores no sólo son capaces de codificar y mantener las características de un objeto sino también la localización espacial en la que se encontraban cuando lo exploraron por primera vez.

Mediante experimentos de lesiones, se han identificado algunas de las áreas que participan en la correcta ejecución de la prueba de localización de objetos (PLO), como la corteza prefrontal medial (Barker y cols, 2007), el hipocampo (Kesner y Giles, 1998) y el fórnix (Ennaceur y Aggleton, 1997).

4.5.5. Prueba de alternancia espontánea

Esta prueba es una medida de la actividad exploratoria, utilizada tanto en roedores (Fowler y cols, 1959) como en otras especies (Brown, 1976;Frederickson y Frederickson, 1979). Suele utilizarse un laberinto en T o un laberinto en Y, en el que se deja explorar al animal libremente los diferentes brazos (Lalonde, 2001). Los roedores normalmente obtienen niveles de alternancia superiores a los estimados para lo que se considera azar (Dember y Fowler, 1958). Sin embargo, la realización de este paradigma se ve influenciada por los niveles de ansiedad (Mitchell y cols, 1985;Bats y cols, 2001) y la capacidad espacial de los animales (Isseroff, 1979;Lalonde y cols, 1986).

Numerosas áreas cerebrales están implicadas en la realización de la prueba de alternancia espontánea (PAS), entre otras, el hipocampo (Johnson y cols, 1977;Taghzouti y cols, 1985), el septo (Clody y Carlton, 1969;Johnson y cols, 1977) y la corteza prefrontal (Divac, 1975).

5. Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso continuo que generalmente compromete el funcionamiento normal de numerosos órganos y sistemas en términos tanto cualitativos, como cuantitativos (Malaguarnera y cols, 2001).

Aunque algunos patrones cognitivos no se ven afectados por el envejecimiento, existen numerosas evidencias de que ciertos aspectos del aprendizaje y la memoria se ven perjudicados con la edad. El sustrato biológico de dichas alteraciones no se conoce con claridad, sin embargo, las nuevas técnicas en neurociencia nos indican que se trata de una acumulación convergente de cambios neurales y fisiológicos. Uno de los mayores problemas para esclarecer el proceso del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento es que las pruebas utilizadas para evaluar el aprendizaje y la memoria en los animales de laboratorio muchas veces no permiten generalizar o realizar comparaciones entre especies. Los estudios con humanos tienen importantes limitaciones, una de ellas el efecto del entorno socio-cultural del sujeto. Mientras que una de las ventajas de trabajar con roedores sería la capacidad de controlar las contribuciones genéticas y ambientales que afectan al envejecimiento y a nuestro estudio en particular (Driscoll y cols, 2006).

El deterioro cognitivo asociado a la vejez es la manifestación de toda una serie de alteraciones neuroanatómicas, histológicas, bioquímicas, metabólicas y hormonales, que suelen desencadenar en la pérdida de funciones cerebrales. Existen numerosas evidencias que indican que niveles elevados de corticosterona durante periodos prolongados a lo largo de la vida, y fundamentalmente próximos a la senectud (etapa en la que el cerebro se vuelve más sensible a la acción de distintos agresores), favorecen el deterioro cognitivo cuando los animales son viejos (Sandi y Touyarot, 2006).

La teoría del envejecimiento conocida como 'hipótesis de la cascada de glucocorticoides' apunta a estructuras como el hipocampo en la desregulación de las respuestas autónomas, neuroendocrinas e inmunes como responsables de las alteraciones asociadas al envejecimiento (Landfield y Eldridge, 1994; Sapolsky y cols 1986). Los agentes protectores del envejecimiento acelerado del cerebro son aquellos que tienen la capacidad de proteger las estructuras clave del cerebro de los efectos adversos y el

daño provocado por situaciones externas o internas que dan lugar a la liberación de radicales libres (McEwen, 2002). Dado que los glucocorticoides pueden producir atrofia dendrítica y muerte neuronal en el cerebro, y que durante el envejecimiento se suele producir un declive en los mecanismos de regulación del eje HHA, en los individuos senescentes se produce un incremento en los niveles de glucocorticoides circulantes (Sapolsky y cols, 1986; Lupien y cols, 1994). En animales jóvenes, el estrés repetido provoca una regulación a la baja del nivel de receptores, lo que disminuye el efecto nocivo del exceso de glucocorticoides circulantes (Sapolsky y cols, 1984b; Herman y cols, 1995). Sin embargo, en la vejez esta regulación se pierde, lo que potencia el efecto de las hormonas de estrés, y por tanto, sus efectos deletéreos sobre el organismo (Kerr y cols, 1991). Se ha propuesto que el estrés crónico podría acelerar el envejecimiento cerebral (Porter y Landfield, 1998). Concretamente, los glucocorticoides estarían provocando una atrofia en el hipocampo (McEwen, 2000), lo cual podría conducir a un déficit en la capacidad de consolidación de la memoria a corto plazo, a una memoria a largo plazo, así como en la memoria espacial (Bach y cols, 1999).

Recientemente se ha demostrado que existe una alteración en el desarrollo de pruebas espaciales y no espaciales dependientes de hipocampo en ratas adultas y viejas (de 12 y 24 meses), la cual es similar al patrón de alteración observado en humanos ancianos en la realización de pruebas análogas (Driscoll y cols, 2006). Estudios en animales han indicado que, con la edad, el hipocampo sufre una serie de cambios progresivos que afectan a su homeostasis para el calcio, a la plasticidad de la respuesta a los glucocorticoides y a la expresión de factores neuroprotectores (McEwen, 2002), que podrían ser la base de las alteraciones cognitivas que muestran las ratas viejas. Anatómicamente, el volumen de la formación hipocampal disminuye con la edad en las ratas cuando se analiza *in vivo* mediante RMf (resonancia magnética funcional), viéndose ya este efecto a los 12 meses de edad. Estos datos concuerdan con numerosa bibliografía en la que se ha demostrado un descenso en el volumen del hipocampo en humanos ancianos (ver revisión (Raz y cols, 2000).

Sin embargo, el envejecimiento no afecta por igual a todos los individuos, y dentro

de una misma edad biológica se pueden manifestar o no más o menos alteraciones tanto fisiológicas como cognitivas. Hay datos que apuntan a que los genes que codifican para productos asociados a la neurodegeneración y el daño neuronal se encuentran regulados de diferente forma en las ratas viejas con alteraciones cognitivas, en comparación con las que mantienen bien conservadas sus capacidades (Sugaya y cols, 1996).

NEUROGÉNESIS Y ENVEJECIMIENTO

El giro dentado del hipocampo es uno de las pocas áreas cerebrales en las que se mantiene la neurogénesis en el adulto, aunque su tasa disminuye en el cerebro durante el envejecimiento en ratas (Kuhn y cols, 1996), ratones (Kempermann y cols, 1998), monos (Gould y Tanapat, 1999) y humanos (Cameron y McKay, 1999; Kukekov y cols, 1999). Este detrimento en la tasa de proliferación de las neuronas hipocámpales se ha propuesto como una de las bases biológicas de los déficits cognitivos asociados a la vejez debido a su relación con el aprendizaje y la memoria (Shors y cols, 2001). Se ha visto que la neurogénesis aumenta en las ratas viejas que han sido sometidas a adrenalectomía (Cameron y McKay, 1999) y en ratones que han disfrutado de un ambiente enriquecido (Kempermann y Gage, 2002), los cuales a su vez mostraron mejores resultados en tareas de aprendizaje, conducta exploratoria y actividad locomotora. Es decir, el bloqueo de la disminución de la tasa de neurogénesis en el cerebro envejecido podría ser una de las estrategias para revertir las disfunciones cerebrales relacionadas con el envejecimiento.

II. Objetivos

Objetivos

A partir de los datos aportados por la literatura así como de experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se deduce que los animales con distinta ansiedad muestran diferencias en sus capacidades de aprendizaje en diversas tareas. Sin embargo, hasta ahora la mayoría de dichos resultados provienen del trabajo con líneas de animales seleccionadas genéticamente y/o diferentes cepas y especies, pero no se ha estudiado de forma sistemática dentro de una misma cepa y abordando de forma simultánea distintas aproximaciones experimentales, como su vulnerabilidad al estrés crónico y a los procesos degenerativos que acompañan al envejecimiento.

En los últimos años, en nuestro laboratorio se ha estudiado la modulación de los niveles cerebrales de NCAM en diversas pruebas de aprendizaje y memoria. Más aún, se ha observado que la administración central de FGL, un péptido sintético mimético de NCAM, favorece la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, una prueba que depende de la correcta función hipocampal. Estos resultados hacen suponer que, administrado sistémicamente, este péptido pueda tener un efecto favorecedor del aprendizaje y la memoria espacial, producir cambios morfológicos en el hipocampo e incluso tener efector neuroprotectores..

Por tanto, en base a los antecedentes presentados nos planteamos las siguientes hipótesis: i) que las diferencias individuales en el rasgo de ansiedad podrían afectar de forma diferente a los animales en sus capacidades cognitivas y en sus estrategias de afrontamiento ante situaciones nocivas como el estrés y el envejecimiento; en dichas diferencias podrían estar implicados distintos mecanismos neurobiológicos. ii) El tratamiento sistémico con un péptido mimético de la molécula de adhesión celular neural podría mejorar las capacidades de los animales en procesos de aprendizaje y memoria, así como prevenir el daño neural y deterioro cognitivo inducido por el estrés crónico y/o asociado al envejecimiento

A la luz de las hipótesis planteadas, los objetivos propuestos a desarrollar en las dos partes experimentales de esta tesis han sido los siguientes:

1. Caracterización del modelo de ansiedad y estudio de la vulnerabilidad al daño inducido por el estrés crónico y/o asociado al envejecimiento

- Caracterizar las diferencias individuales en los niveles de ansiedad de una población normal de ratas macho de la cepa Wistar clasificando a los animales en tres grupos: alta ansiedad, ansiedad intermedia y baja ansiedad.
- Evaluar los elementos fisiológicos y/o moleculares que subyacen al rasgo de ansiedad característico de cada grupo. En particular investigaremos: i) actividad del eje HHA y del SNA, ii) expresión e implicación funcional de los receptores de glucocorticoides hipocampales y corticales, iii) expresión e implicación funcional de NCAM y su forma polisializada en el hipocampo y en la corteza frontal.
- Profundizar en el estudio de la posible interacción existente entre la ansiedad intrínseca de los animales y diversos tipos de aprendizaje y memoria, analizando de forma más exhaustiva el condicionamiento del miedo al tono mediante la utilización de varios abordajes experimentales.
- Comprobar si el comportamiento emocional de ansiedad de los animales se puede considerar un 'rasgo' perdurable en el tiempo o por el contrario es un estado transitorio.
- Estudiar si la ansiedad de los animales puede ser un factor determinante en la vulnerabilidad de los animales al deterioro cognitivo inducido por el estrés crónico impredecible y/o asociado al envejecimiento, así como si dichas situaciones alteran fisiológica y molecularmente a diversos parámetros: i) respuesta del eje HHA al estrés agudo y crónico, ii) expresión e implicación funcional de las moléculas previamente mencionadas y además del FGF y su receptor, también tanto en el hipocampo como en la corteza frontal.

2. Estudio del efecto del FGL sobre el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica. Papel neuroprotector del FGL frente al daño inducido por el estrés crónico.

- Estudiar si la administración periférica de FGL – un péptido sintético mimético de NCAM -a ratas jóvenes es capaz de mejorar el aprendizaje y/o la memoria espacial.
- Comprobar si dicho tratamiento es capaz de modular la densidad de las espinas dendríticas en la neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.
- Evaluar el efecto de la administración subcutánea del FGL a ratas adultas durante un protocolo de estrés crónico, tanto en las capacidades cognitivas de los animales, como en la supervivencia neuronal en el hipocampo, durante el envejecimiento.

III. Material y Métodos

1. Animales de experimentación

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar provenientes de *Harlan Interfauna Ibérica S.A.* (Barcelona, España), con libre acceso a pienso de mantenimiento (RMM, Ibérica, S.A.) y bebida (agua corriente). Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12:12 horas luz-oscuridad (de 8 a.m. a 8 p.m.) y condiciones de temperatura y humedad constante ($22 \pm 2^\circ \text{C}$ y 50% HR). El fondo de cada jaula estuvo cubierto por una capa abundante de viruta de forma que proporcionara un buen grado de desinfección y de absorción de elementos líquidos, constituyendo por tanto un lecho confortable para los animales. El cuidado de las ratas se llevó a cabo según las normas propuestas por la Comunidad Europea (86/609/EEC).

Los animales llegaron a nuestro estabulario con 225-250 gramos de peso y fueron distribuidos en grupos de 3 ratas por caja. Durante las semanas siguientes, las ratas fueron sometidas a la manipulación rutinaria del animalario y fueron pesadas una vez por semana para evaluar su curva de crecimiento.

Durante los tres días anteriores al comienzo de las pruebas comportamentales los animales fueron manipulados a diario por el experimentador. La manipulación consistió en el transporte desde el estabulario hasta la habitación en donde se realizarían las pruebas experimentales, donde permanecieron dos minutos en las manos del experimentador.

2. Pruebas conductuales y cognitivas

2.1. Laberinto en cruz elevado (LCE)

El LCE es una prueba validada para el estudio de la ansiedad en roedores, que se basa en la aversión que éstos experimentan a la altura y a los espacios abiertos (Lister, 1987). Se ha visto que el porcentaje de tiempo empleado en la exploración de los brazos abiertos es el parámetro que mejor estima los niveles de ansiedad del animal (Pellow y cols, 1985).

Aparato

Esta prueba se llevó a cabo en un aparato con 4 brazos (2 abiertos y 2 cerrados) de 45 x 10 cm dispuestos en forma de cruz (ver Figura 4) y elevados a una altura de 65 cm desde el suelo. Los brazos cerrados tienen una pared de 50 cm de altura. Estos cuatro brazos se unen a través de una plataforma central de 10 x 10 cm.

El comportamiento de cada animal fue monitorizado por una cámara de vídeo colocada en el techo, justo encima del centro del aparato y analizado por un sistema computerizado (EthoVision 3.0, Noldus IT, Wageningen, Holanda).

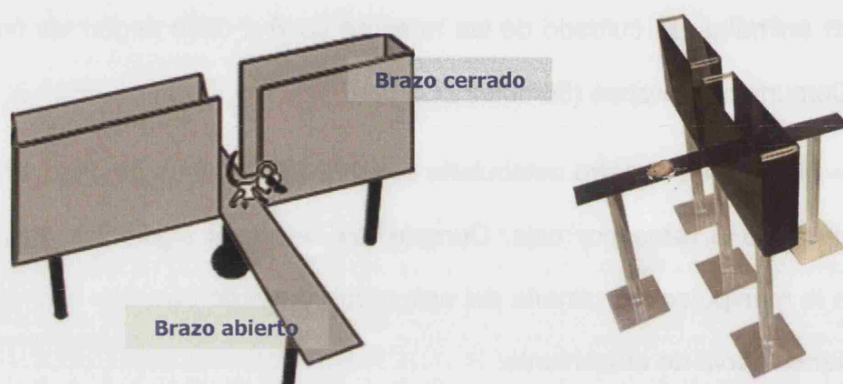


Figura 4. Representación y esquema del LCE

Procedimiento experimental

Al inicio de la prueba, la rata era colocada en la plataforma central con la cabeza mirando hacia uno de los brazos cerrados y dejándola en completa libertad de movimiento, mientras se registró su conducta a lo largo de toda la sesión. La duración de cada sesión fue de 5 minutos.

Medidas registradas durante cada sesión:

- Tiempo de permanencia en cada zona del laberinto: brazos abiertos, brazos cerrados y plataforma central. Se registró el tiempo total en segundos así como el porcentaje de tiempo con respecto al total.
- Número de entradas a cada brazo.
- Número de veces y tiempo (en segundos y porcentaje) que el animal asomó la cabeza por encima del borde de cualquiera de los brazos abiertos (equivalente al

término anglosajón *head-dipping*).

- Tiempo de inmovilidad o congelamiento (en segundos y porcentaje) (equivalente al término anglosajón *freezing*).
- Número de veces y tiempo (en segundos y porcentaje) en las que el animal se incorporó sobre las patas traseras (equivalente al término anglosajón *rearing*).
- Número de veces y tiempo de acicalamiento (en segundos) (equivalente al término anglosajón *grooming*).
- Número de defecaciones.
- Distancia total recorrida en centímetros.

2.2. Campo abierto (CA)

La prueba de campo abierto se realizó con el fin de evaluar la reactividad de los animales a un ambiente novedoso.

Aparato

Esta prueba se llevó a cabo en un espacio circular construido en PVC negro de 150 cm de diámetro, rodeado de una pared de 30 cm de alto (ver Figura 2). El suelo está virtualmente dividido en zonas concéntricas, siendo las más importantes la interna o central de 100 cm de diámetro, y la más externa o periférica de 25 cm de ancho. El comportamiento de cada animal fue monitorizado con una cámara de vídeo colocada en el techo, justo encima del centro del aparato y un sistema computerizado (EthoVision 3.0, Noldus IT, Wageningen, Holanda).

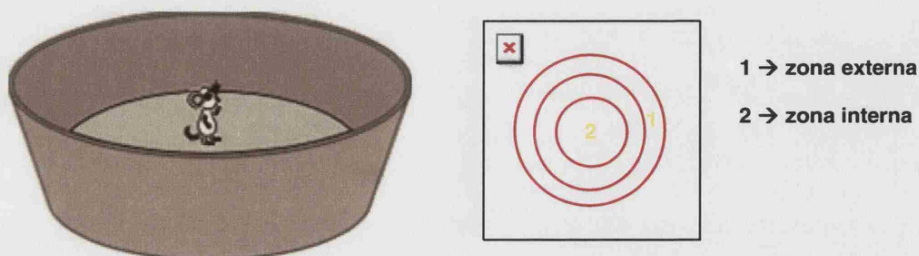


Figura 5. Representación y esquema del CA

Procedimiento experimental

Al inicio de la prueba, la rata fue situada mirando a una pared del campo abierto y se dejó en completa libertad de movimiento, procediéndose a registrar su conducta. La duración de las sesiones fue de 10 minutos.

Medidas registradas durante cada sesión:

- Tiempo de permanencia en cada zona del campo en segundos y en porcentaje de tiempo con respecto al total.
- Tiempo de inmovilidad o congelamiento, en segundos.
- Número de veces y tiempo de alzamiento sobre dos patas, en segundos.
- Número de veces y tiempo de acicalamiento o autolimpiado, en segundos.
- Distancia total recorrida, en centímetros.
- Velocidad media, en centímetros/segundo
- Número de defecaciones.

2.3. Caja luz-oscuridad (CLO)

La CLO se basa en el conflicto entre la tendencia de los roedores a explorar un nuevo entorno y las propiedades aversivas de un espacio abierto e iluminado (Crawley y cols, 1985). Tanto una disminución en el tiempo que pasa el animal en el lado iluminado, como un incremento en la latencia a salir desde la zona oscura pueden ser interpretados como un incremento de la ansiedad (Finn y cols, 2003)

Aparato

Esta prueba se realizó en una caja de plástico con 2 compartimentos de 25 x 23 x 25 cm cada uno. Unos de ellos, de color negro, está cubierto por una pieza móvil a modo de tapa que hace que no reciba luz del exterior; mientras que el compartimento blanco está iluminado desde arriba por una bombilla (100 lux) (ver Figura 6). Ambos compartimentos están conectados por una pequeña abertura de 8 x 10 cm localizada en la mitad de la pared que los separa, al nivel del suelo.

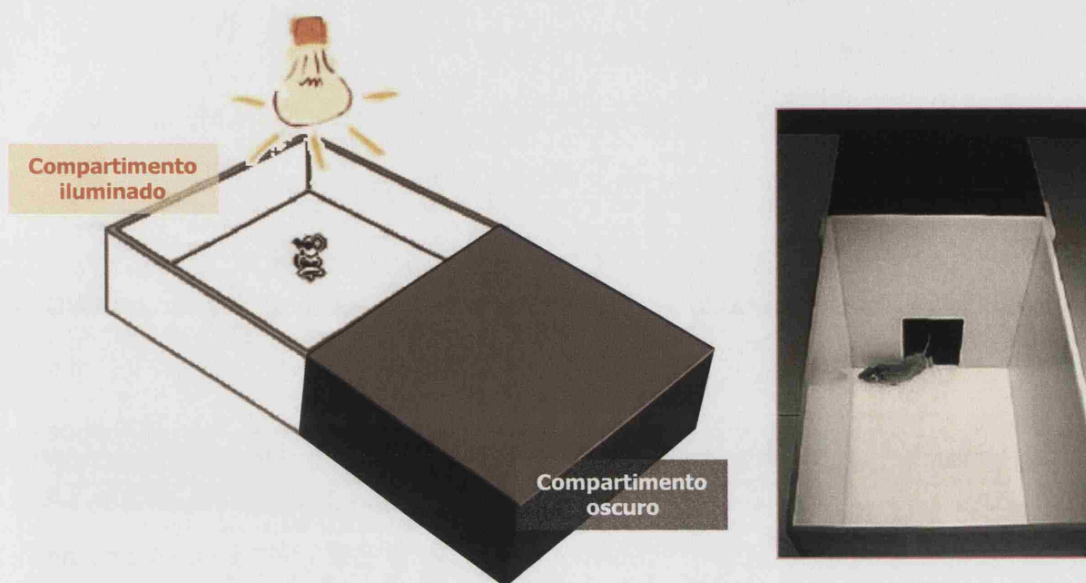


Figura 6. Representación y esquema de la CLO

Procedimiento experimental

La prueba daba comienzo introduciendo al animal en el compartimento negro con la cabeza orientada hacia la pared. A continuación, se dejó que la rata explorara libremente el aparato durante 5 minutos.

Medidas registradas durante cada sesión:

- Tiempo transcurrido hasta que el animal entró en el compartimiento blanco, en segundos. Número de defecaciones.
- Tiempo durante el cual el animal permaneció en el compartimiento blanco, en segundos y porcentaje.
- Número de veces que el animal entró en el compartimiento blanco.
- Número de defecaciones.
- Número de veces que el animal asomó la cabeza hacia el compartimiento blanco

Al final de cada una de estas pruebas – LCE, CA, CLO – se limpió el aparato con una solución de ácido acético al 0,1%, para eliminar claves olfativas, secándose completamente antes de iniciar la sesión con la siguiente rata.

2.4. Laberinto acuático de Morris (LAM)

Prueba de aprendizaje espacial desarrollada por Richard Morris (Morris y cols, 1982).

Aparato

El laberinto acuático utilizado consistió en un estanque circular construido en PVC negro, de 2 m de diámetro y 45 cm de alto. En uno de los 4 cuadrantes en los que virtualmente se divide la piscina, se coloca una plataforma negra circular de 11 centímetros de diámetro, cuyo centro queda equidistante de la pared y del centro de la piscina. La superficie de la misma consta de una rejilla metálica que facilita que los animales no resbalen al subir. Alrededor de la piscina y por fuera de ésta, hay cortinas de diferente color sobre las que se sitúan además motivos de colores y texturas variadas, cuya posición se mantiene durante todo el experimento y que sirven de claves de referencia para que el animal sitúe la localización de la plataforma con respecto a dichas señales (ver Figura 7).

En cada sesión, la piscina se llenó con agua a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta alcanzar una profundidad de 32 centímetros sobre el fondo de la misma. Esto permitía que, durante las sesiones de entrenamiento, la plataforma permaneciera escondida para los animales al quedar a 2 centímetros por debajo de la superficie del agua.

Para realizar los análisis correspondientes, la piscina se divide virtualmente en cuatro cuadrantes de igual medida, diferenciando una zona central de 160 cm de diámetro y un pasillo periférico de 20 cm. En la mitad de uno de los cuadrantes se encuentra la plataforma de escape y a su alrededor se definió un área virtual de 20 cm de diámetro que nos ayudaría a evaluar la persistencia de los animales en buscar la posición exacta de la plataforma y que denominamos AP (área alrededor de la plataforma).

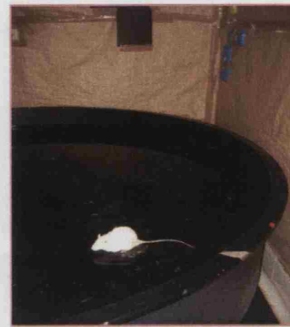
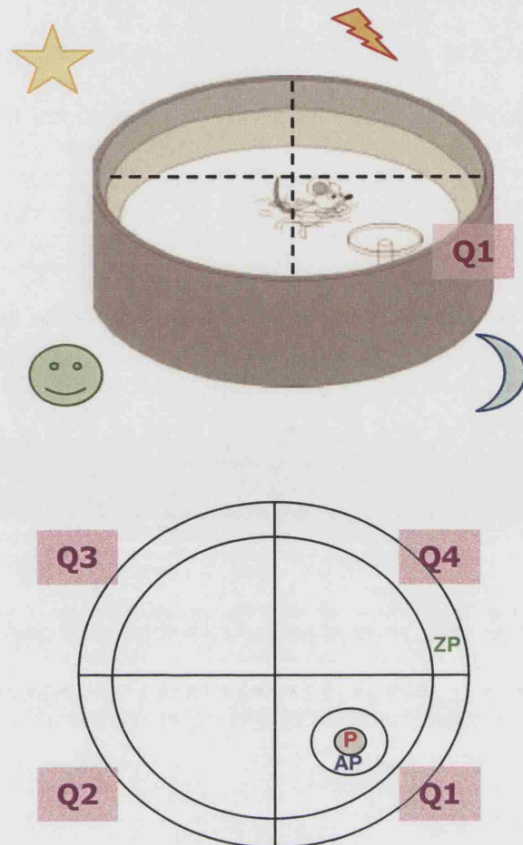


Figura 7. Representación y esquema del laberinto acuático de Morris, donde Q1 es el cuadrante diana y Q3 es el cuadrante opuesto. P → plataforma
AP → área que rodea la plataforma

Procedimiento experimental

Se determinaron cuatro posiciones de comienzo alrededor del perímetro de la piscina que se usaron de forma aleatoria en cada sesión, aunque dicho orden fue el mismo para cada rata perteneciente a un mismo experimento.

Cada ensayo comenzaba situando la rata en el agua con el cuerpo orientado hacia la pared de la piscina, en una de las posiciones de comienzo. Tras el último ensayo de la sesión correspondiente, la rata era llevada a la habitación adyacente dejándose en una jaula individual cercana a una fuente de calor para facilitar su secado. Una vez la que rata estuvo seca, se devolvió al estabulario.

El aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris se evaluó, dependiendo de cada experimento, mediante diferentes *test* o pruebas, que se detallan a continuación:

1) *Sesión/es de entrenamiento*: en función del protocolo experimental y de los objetivos de cada experimento particular, el entrenamiento consistió en dos o tres sesiones por día. El número de ensayos por sesión osciló también entre tres y cuatro. El tiempo máximo de cada ensayo fue de 120 segundos y en caso de que la rata no encontrara la

plataforma, fue guiada con la mano hasta la misma. Una vez allí, el animal permanecía sobre la plataforma durante 30 segundos más. Transcurrido este periodo de tiempo, era colocado sobre una toalla y llevado al exterior de las cortinas que rodeaban la piscina, donde permanecía otros 30 segundos, antes de comenzar un nuevo ensay

2) Prueba de retención: evalúa la fuerza con la que se ha establecido la memoria espacial 24 horas después de la última sesión de entrenamiento. Consistió en un único ensayo, de 60 o 90 segundos (según el protocolo), durante el cual el animal nadó libremente en la piscina de la que previamente se ha retirado la plataforma. El recuerdo puede evaluarse por la latencia en localizar el enclave exacto donde estuvo situada la plataforma así como por la frecuencia de los cruces sobre el enclave donde estuvo la plataforma o el porcentaje de tiempo dedicado a la búsqueda en el cuadrante diana (cuadrante donde estuvo localizada la plataforma durante el entrenamiento).

Medidas registradas durante el entrenamiento y la prueba de retención:

- Latencia o tiempo total que las ratas necesitaron para localizar la plataforma el enclave exacto donde estuvo previamente emplazada (en segundos).
- Distancia recorrida por los animales hasta la localización de la plataforma (en centímetros).
- Velocidad media de natación (en centímetros/segundo).
- Porcentaje de tiempo durante el cual las ratas nadaron en el cuadrante diana y en AP en el caso de la prueba de memoria.
- Porcentaje de tiempo durante el cual las ratas nadaban en la zona central y en la periférica (tigmotaxis).

2.5. Condicionamiento del miedo (CM)

Paradigma utilizado para evaluar tanto el aprendizaje como la memoria de tipo emocional.

Aparato

Este tipo de aprendizaje se llevó a cabo en cajas tipo Skinner (29x37x25 cm) con 20 varillas metálicas en el suelo (la distancia entre varillas es de 1.5 cm y su diámetro es de 4 mm) y, debajo de éstas, una bandeja con viruta (ver Figura 8). Cada caja está emplazada dentro de una cámara de aislamiento con las siguientes dimensiones interiores (61,5x43x45 cm y exteriores 70x51,5x53 cm). La pared frontal es una pantalla de plexiglás roja, a fin de facilitar la observación de la conducta del animal. Esta cámara está equipada con un sistema de ventilación que emite un sonido monótono de 68 dB y una luz de 20 W, cuya función es aislar el módulo acústica y lumínicamente del exterior.

Se utilizó como *estímulo incondicionado* una descarga eléctrica de 0,4 mA de intensidad administrada mediante un sistema automático controlado por el programa SKINNER versión 1,2 de la empresa CIBERTEC, S.A., y un circuito generador de descargas eléctricas de corriente constante de la empresa LETICA Instrumentos Científicos (LI100-26 Shocker), cuyo suministro depende de la intensidad del valor seleccionado y no de la resistencia que proporciona el cuerpo del animal, de modo que los animales de cada grupo reciben exactamente la misma intensidad de choque eléctrico. El *estímulo condicionado*, en el caso del condicionamiento de miedo al tono y de la inhibición latente, fue un tono de 85 dB y una frecuencia de 1000 Hz.

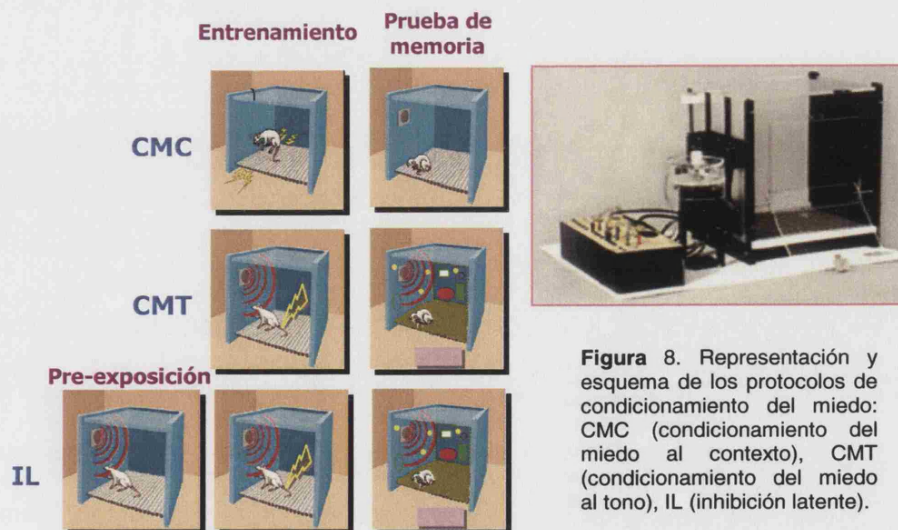


Figura 8. Representación y esquema de los protocolos de condicionamiento del miedo: CMC (condicionamiento del miedo al contexto), CMT (condicionamiento del miedo al tono), IL (inhibición latente).

Procedimiento experimental

Se realizaron tres protocolos experimentales:

2.5.1 Condicionamiento del miedo al contexto (CMC)

Este paradigma constó de las siguientes fases:

- 1) *Entrenamiento*: cada rata era colocada en el interior de una caja de condicionamiento. En un período inicial de 180 segundos, los sujetos exploraron libremente la jaula; inmediatamente después, el animal recibió 3 descargas de un segundo de duración en las patas, con un intervalo de separación entre éstas de 1 minuto y dejando 30 segundos tras la última descarga, siendo la duración total de la sesión de entrenamiento de 5 minutos y medio. Inmediatamente después los animales fueron devueltos a su jaula.
- 2) *Prueba de memoria*: 24 horas después del entrenamiento, las ratas fueron expuestas de nuevo a la misma caja donde habían sido entrenadas, registrando su conducta durante 8 minutos.
- 3) *Extinción de la conducta de miedo*: una semana después, los animales fueron reexpuestos a la caja durante 8 minutos, tres veces consecutivas dejando una hora entre cada reexposición,

2.5.2. Condicionamiento del miedo al tono (CMT)

- 1) *Entrenamiento*: el protocolo fue idéntico al ya descrito para el CMC, pero en este caso las descargas fueron precedidas por un tono (anteriormente descrito) de 20 segundos.
- 2) *Prueba de memoria*: 48 horas después del entrenamiento el animal se introdujo en una caja de diferentes características y olor a aquella en donde fueron entrenadas. Durante los 3 primeros minutos se permitió que los animales exploraran libremente y después se les presentó el tono durante 5 minutos.

2.5.3 Inhibición latente (IL)

El proceso de inhibición latente se define como el retraso en el condicionamiento a un estímulo cuando dicho estímulo ha sido preexpuesto previamente de forma repetida sin ninguna consecuencia. Se considera un índice de la capacidad de los individuos para ignorar estímulos que prevén que no tendrán consecuencias significativas (Weiner y Feldon, 1997).

Las fases de esta prueba fueron:

- 1) *Pre-exposición*: se habituó a los animales al mismo estímulo condicionado (tono) que precede a la descarga, pero en ausencia de ella. Para ello se introdujeron en la caja de condicionamiento y se les expuso a 30 secuencias de tono de 30 segundos cada una, separadas por 30 segundos en ausencia de tono. La duración total de esta fase fue de 30 min.
- 2) *Entrenamiento*: ver protocolo de CMT.
- 3) *Prueba de memoria*: ver protocolo de CMT.

Tras cada sesión experimental realizada con un animal en la caja de condicionamiento, se limpiaron el suelo y las paredes con ácido acético al 0,1%, se secaron completamente las rejillas y se cambió la viruta de la bandeja inferior.

La conducta de los animales fue grabada mediante una videocámara para su posterior evaluación.

Medidas registradas durante el entrenamiento y la prueba de memoria:

- Tiempo de congelamiento o inmovilización (en segundos y en porcentaje). Esta conducta es definida como la ausencia de movimiento visible, excepto el necesario para respirar. El tiempo durante el cual se produce suele considerarse un buen indicador del nivel de miedo provocado por el estímulo incondicionado (en este caso la descarga eléctrica). Esta medida se registró cada 2 segundos.
- Número de defecaciones.
- Tiempo de acicalamiento (en segundos y porcentaje)

2.6. Prueba de reconocimiento de objetos (PRO)

Nos permite evaluar la conducta espontánea de los animales a explorar los nuevos objetos de su entorno (Ennaceur y Delacour, 1988)

Aparato

En esta prueba de memoria, las ratas se familiarizaron con dos objetos idénticos situados en una arena a la que habían habituadas previamente. Tras un intervalo de tiempo variable, las ratas volvieron a la caja en donde se encuentran uno de los objetos ya conocidos y uno nuevo. Si los animales recuerdan el objeto familiar, tienden a explorar más tiempo el objeto novedoso (Ennaceur y Delacour, 1988).

Esta prueba se llevó a cabo en una caja rectangular de plexiglax opaco (55x40x20) con el fondo cubierto de viruta y con una intensidad de luz uniforme en todas las zonas de la misma (ver figura 9).

Los objetos utilizados tenían diferentes texturas, colores y formas y no podían ser desplazados por las ratas.

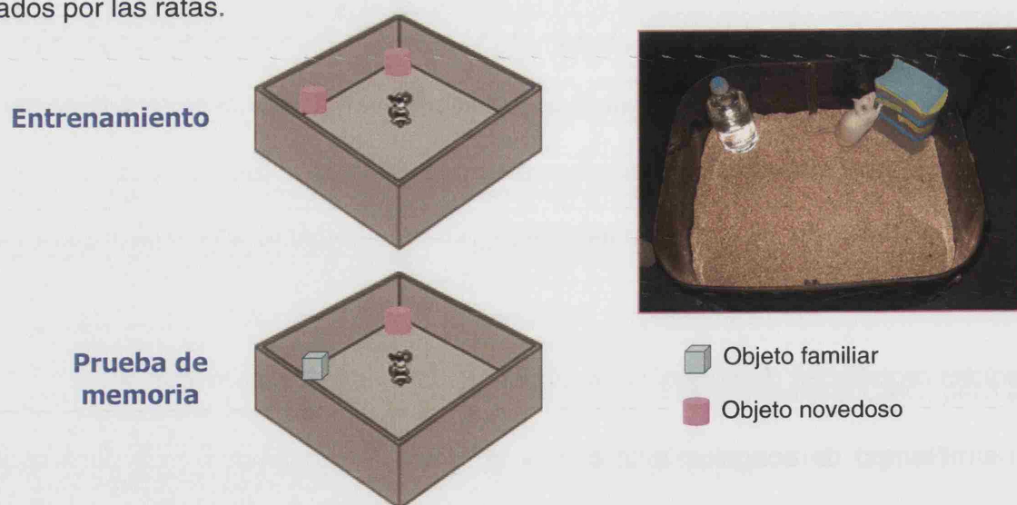


Figura 9. Representación y esquema de la arena utilizada en la PRO

Procedimiento experimental

La prueba constó de tres fases:

- **Habitación al contexto:** las ratas exploraron la caja durante 5 minutos al día, los 5 días anteriores al inicio de la prueba.
- **Entrenamiento:** 24 horas después del último día de habitación, las ratas

fueron expuestas a dos objetos idénticos o familiares (F1 y F2) que debían explorar un máximo de 30 segundos, momento en el cual se retiraron de la caja. En esta fase, el tiempo máximo de permanencia de los animales en la arena fue de 3 minutos.

■ *Prueba de memoria:* un día después del entrenamiento, se presentaron a las ratas dos objetos diferentes, uno de ellos familiar, y uno distinto que no ha visto antes (objeto novedoso, N), dejando que exploraran durante 3 minutos.

En todas las sesiones los objetos se colocaron en las esquinas posteriores de la caja, a 5 cm de la pared. La posición de los mismos era cambiada aleatoriamente entre las dos esquinas posteriores opuestas para evitar una posible preferencia por un objeto y/o lugar de la arena.

Entre sesiones los objetos se limpiaron cuidadosamente con ácido acético al 0,1%, y la viruta fue cambiada.

Todos los datos conductuales fueron registrados manualmente por el experimentador que se encontraba situado tras una mampara, con el fin de evitar interferir en el comportamiento de los animales.

Medidas registradas durante el entrenamiento y la prueba de memoria:

- Segundos de exploración de cada uno de los objetos
- Número de defecaciones

Parámetros analizados durante el entrenamiento y la prueba de memoria:

- Tiempo total (en segundos) explorado de los dos objetos idénticos durante el entrenamiento.
- Tiempo (en segundos) explorado de cada objeto durante la prueba de memoria.
- Índice de discriminación (ID), que es la diferencia en el tiempo de exploración dividido por el tiempo total de exploración de ambos objetos durante la prueba de memoria: $(N-F/N+F)$.

Se consideró que la rata estaba explorando un objeto cuando dirigía el hocico directamente hacia el objeto, a una distancia de 1 cm o menor, y/o lo tocaba con el hocico.

Sin embargo, dar vueltas alrededor, trepar o morder los objetos no fueron consideradas como conductas exploratorias.

2.7. Prueba de localización de objetos (PLO)

En esta versión de paradigma de preferencia a la novedad, las ratas tenían que reconocer que había un objeto en un lugar de la arena donde previamente no había ninguno. Si los animales recordaban las posiciones de los objetos en la fase de entrenamiento debían explorar más tiempo el objeto situado en la nueva localización que aquel que permanecía en la misma posición (Ennaceur y cols, 1997).

Aparato

Utilizamos una caja cuadrada (80cm x 80cm x 50cm) de material PVC opaco gris (ver Figura 10).

Los objetos a discriminar estaban hechos de plástico y eran lo suficientemente pesados para que no pudieran ser movidos.

Las ratas se colocaron en la arena de espaldas a los objetos.

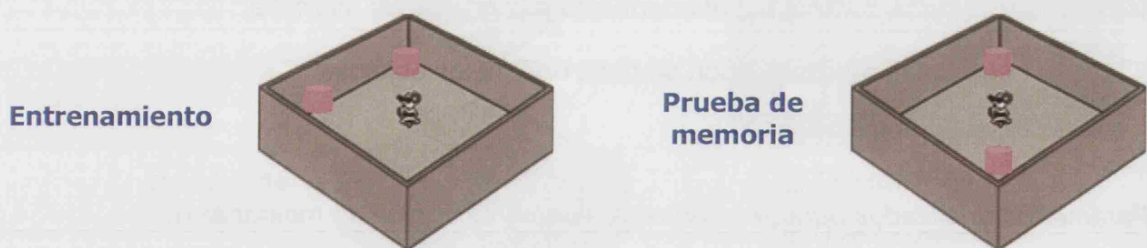


Figura 10. Esquema de la arena utilizada en la PLO

Procedimiento experimental

La prueba constó de tres fases:

- *Habitación al contexto*: las ratas exploraron la caja durante 5 minutos al día, los 5 días anteriores al inicio de la prueba.
- *Entrenamiento*: 24 horas después del último día de habituación, las ratas fueron expuestas a dos objetos idénticos. En esta fase, el tiempo máximo de

permanencia de los animales en la arena fue de 3 minutos.

■ *Prueba de memoria:* 8 minutos después del entrenamiento. Uno de los objetos se cambió de posición dejando que exploraran durante 3 minutos.

El modo de proceder con los objetos y su limpieza fue idéntico al indicado para la PRO.

Todos los datos conductuales fueron registrados mediante una cámara situada sobre la caja y analizada por el programa Ethovisión 3.0.

Medidas registradas durante el entrenamiento y la prueba de memoria:

- Segundos de exploración de cada uno de los objetos
- Número de defecaciones

Parámetros analizados durante el entrenamiento y la prueba de memoria:

- Tiempo total (en segundos) explorado de los dos objetos idénticos durante el entrenamiento.
- Tiempo (en segundos) explorado de cada objeto durante la prueba de memoria.
- Índice de discriminación (ID), que es la diferencia en el tiempo de exploración dividido por el tiempo total de exploración de ambos objetos durante la prueba de memoria: $(N-F/N+F)$.

Se consideró que la rata estaba explorando un objeto ateniéndose al mismo criterio utilizado en la PRO.

2.8. Prueba de alternancia espontánea (PAE)

La alternancia espontánea es una medida de exploración muy utilizada en roedores, los cuales al ser expuestos a un laberinto en T o en Y tienen una fuerte tendencia a alternar la elección de brazos en los que entran (Lalonde, 2002).

Aparatos

La PAE continua o libre se realizó en un laberinto en Y de brazos simétricos hecho de madera y pintado de negro, cuyas dimensiones eran 50cm x 30cm x 14cm.

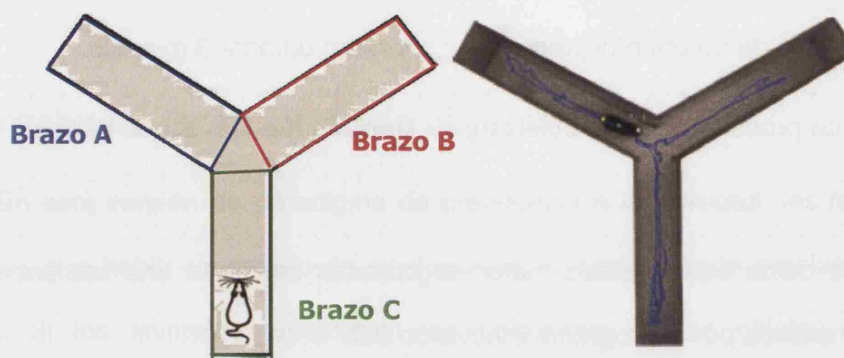


Figura 11. Representación y esquema del laberinto en Y utilizado en la PAE

Procedimiento experimental

Cada rata tenía acceso libre a los tres brazos durante 8 minutos, durante los cuales se registró la secuencia de entrada a los brazos mediante una cámara situada sobre el aparato.

Las medidas registradas y analizadas fueron:

- Número total de entradas a los brazos
- Secuencia de entradas a los brazos
- Medidas conductuales como número y porcentaje de posturas verticales, porcentaje de tiempo de acicalamiento, porcentaje de tiempo de inmovilización.

El principal parámetro de estudio en esta prueba es el Índice de Iternancia (IA). La alternancia se define como la entrada en tres brazos diferentes de forma consecutiva. Para obtener el IA el número de alternancias se divide por el número total de entradas a los brazos menos uno.

3. Protocolo de estrés crónico e impredecible (ECI)

El ECI consistió en someter a las ratas a un conjunto de situaciones estresantes aleatorias, diferentes cada día y que incluso fueron llevadas a cabo a diferentes horas del día. Este paradigma fue diseñado para evitar la habituación de la respuesta neuroendocrina de estrés que se produce ante la repetición de un mismo estresor (Armario y cols, 1986; Pitman y cols, 1988)

Las pruebas estresantes a las que los animales fueron sometidos son:

- *Descarga eléctrica de 0.4mA en las patas*: los animales recibieron 3 descargas de 1 segundo de duración separadas por 1 minuto.
- *Plataforma elevada*: las ratas tienen una aversión natural por los lugares elevados y los espacios abiertos e iluminados. Así pues, se dejaron los animales sobre una plataforma elevada a 1,20 m del suelo y con una base de rejilla para evitar que resbalaran. La base está rodeada de paredes para evitar que escapen en caso de que cayeran de la plataforma. El tiempo de duración de esta prueba fue de 1 h.
- *Hacinamiento*: las ratas macho son animales muy territoriales, por lo que agruparlas en un recinto pequeño de forma que tengan el mínimo espacio disponible supone para ellas una situación muy estresante. Se mantienen juntas durante 1 h.
- *Agitación*: agrupadas de 5 en 5 fueron agitadas en una plataforma durante 20 minutos a intensidad moderada.
- *Inestabilidad social*: esta prueba consistió en intercambiar los compañeros de jaula cada cierto tiempo, provocando así el enfrentamiento que se produce entre los machos por el espacio y por colocarse en la posición dominante con respecto a los otros dos individuos de la jaula de estabulación. Todos los animales del grupo de estrés se mezclaron al menos una vez por semana.
- *Inmovilización*: en la rata está ampliamente estudiado el efecto estresante del protocolo de inmovilización mediante un cepo que restringe los movimientos del

animal. En este protocolo, los animales permanecieron inmovilizados en los cepos durante media hora bajo una luz blanca intensa.

- *Individualización*: los animales se aislaron en jaulas individuales durante 24 horas, manteniendo su ciclo de luz y con libre acceso a agua y comida.

Una vez finalizado el protocolo de ECI de 28 días, las ratas fueron sometidas a un recordatorio del mismo (una prueba aleatoria de las anteriormente mencionadas) o bien una vez al mes o una vez a la semana, en función del experimento, hasta la semana anterior al inicio de las pruebas conductuales.

4. Adrenalectomía

Este procedimiento conlleva la extirpación total de ambas glándulas suprarrenales, incluyendo tanto la corteza como la médula de las mismas. Como resultado puede quedar alterado el almacenamiento y uso de la glucosa, así como la capacidad para mantener los niveles de ciertos electrolitos y una hidratación corporal normal. A las ratas adrenalectomizadas se les colocó subcutáneamente una pastilla que libera corticosterona de manera uniforme, y que permite mantener unos niveles bajos de hormona en el plasma, pero suficientes para paliar los efectos secundarios derivados de la falta de respuesta adrenal.

Las ratas se dividieron en dos grupos experimentales:

- *ADX* → adrenalectomizados, a los que se les extirparon completamente las glándulas suprarrenales
- *Sham* → término anglosajón que significa 'falso' y con el que se hace referencia a aquellos animales a los que se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico pero sin extracción de las glándulas.

Para llevar a cabo las operaciones, los animales se anestesian mediante una inyección i.p. de Ketamina (80 mg/kg), Diazepam (10mg/kg) y Atropina (0,05 mg/kg). Una

vez que los animales estuvieron completamente dormidos, accedimos a las glándulas suprarrenales haciendo una incisión en la piel paralela a la columna vertebral a nivel lumbar, y cortando la pared muscular. Una vez retiradas las glándulas, la grasa abdominal periadrenal fue colocada de nuevo en la cavidad abdominal, y el músculo y la piel cosidos y tratados con pomada antibiótica para evitar las infecciones.

Durante los primeros 5 días todas las ratas fueron tratadas con un analgésico (Metacán, tres gotas en el agua de bebida) en el agua de bebida para facilitar la recuperación post-quirúrgica.

5. Tratamientos farmacológicos

Buspirona

- Buspirona (N-(4-[4-(2-pirimidinil)-1-piperazinil]butil)-8-azaspiro[4,5]decano-7,9-diono hidroclicida) (SIGMA): 0,1 mg/Kg disuelta en vehículo.
- Vehículo: salino 0,9%.

Las ratas fueron inyectadas subcutáneamente con este agonista parcial del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} una hora antes de las pruebas conductuales. Era necesario escoger una dosis lo suficientemente eficaz como para disminuir los niveles de ansiedad de los animales HA, pero a su vez, lo más baja posible para evitar que se vieran afectados otros parámetros que podrían influir en el resultado, tales como la actividad locomotora o la liberación de glucocorticoides, ya que un estudio previo de de Boer y colaboradores (De Boer y cols, 1990) encontró que dosis superiores a 1 mg/Kg inducen la liberación de corticosterona. Elegimos la dosis de 0,1 mg/kg basándonos en un estudio previo del grupo de Griebel (Griebel y cols, 1997) en el que comprobaron que esta dosis era capaz de aumentar el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del LCE comparado con los controles sin alterar su capacidad locomotora, ya que a partir de la dosis de 0,3 mg/kg, comenzaba a verse afectada ésta función.

■ **FGL – Péptido sintético FGloop mimético de NCAM**

- FGL_L(E. Bock): 6.6 mg/Kg, 2 mg/ml en vehículo
- Vehículo: (50% agua destilada, 50% salino 0.9%)

Fueron administrados subcutáneamente.

■ **BrdU**

- BrdU (SIGMA): 50 mg/Kg disuelto en salino 0.9%.

Las ratas recibieron 2 inyecciones intraperitoneales diarias durante 5 días consecutivos.

6. Técnicas bioquímicas

6.1. Determinación de corticosterona plasmática mediante la técnica de RIA

Para la determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona se recogió la sangre en tubos impregnados con heparina sódica. Los tubos se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 20 minutos a 4° C y se recogió el sobrenadante obtenido, almacenándose este plasma a -80° C para su posterior determinación.

Los niveles de corticosterona plasmática se midieron utilizando un radioinmunoensayo (Kit de Diagnostics Products Corporation, CA, USA).

El radioinmunoensayo (RIA) se basa en la competencia que se establece entre la sustancia a cuantificar y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo por unirse a un anticuerpo específico. Cuanto mayor sea la cantidad de sustancia de la muestra, menor será la cantidad de sustancia radiactiva que se una al anticuerpo y viceversa (Morikis y Lambris, 2004).

En nuestro caso, el isótopo radiactivo fue corticosterona marcada con yodo 125 (¹²⁵I). Los tubos de polipropileno suministrados por Diagnostic Products Corporation (CA, USA) llevan el anticuerpo a concentración constante adherido en las paredes.

El procedimiento fue el siguiente:

- En cada tubo se introdujeron 50 µl de la muestra o de la curva patrón realizada a

partir de antígeno no radiactivo de concentración conocida

- A continuación se añadió 1 ml del antígeno radiactivo.

- Se dejó reposar 2 horas

- Se decantaron los tubos y se introdujeron en un contador de radiación gamma (Wizard 1470 Wallac), que ofrece los resultados en unidades de cuentas por minuto (cpm).

La concentración de las muestras problema se calculó a partir de una representación semilogarítmica de la curva estándar. Se calcula para cada tubo la media de unión específica corregida. Para ello, se resta el valor de la unión no específica a los resultados obtenidos en cada tubo. Con ello, se obtienen las cuentas netas o corregidas, dado que se elimina la cantidad de corticosterona que se ha unido inespecíficamente. Con las cuentas netas se calcula el porcentaje de unión del antígeno al anticuerpo en función de la unión específica (100% de unión). La sensibilidad de este kit era de 5,7 ng/ml.

6.2. Determinación de los niveles de glucosa en sangre

Para la determinación de los niveles de glucosa se utilizó un Analizador de glucosa en sangre capilar (Glucocard Memory 2, A. Menarini Diagnostics). La varilla medidora se aplicó directamente sobre una pequeña incisión realizada en el último tercio de la cola del animal, obteniendo el resultado 30 segundos después. El rango de lectura de dicho analizador es de 20 a 600 mg/Dl.

6.3. Cuantificación de los niveles de receptores de glucocorticoides, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 1, moléculas de adhesión celular y factor de crecimiento de fibroblastos de tejido cerebral

6.3.1. Obtención de homogenados y sinaptosomas

La homogeneización de tejido previamente diseccionado y congelado se llevó a cabo con la ayuda de un homogeneizador manual de cristal de 1 ml de capacidad.

1. Obtención de homogenados

- Se introdujo el tejido en el homogeneizador y se añadió un volumen de tampón Krebs de lisis (10,95 gr de sucrosa por cada 100 ml de agua destilada con HEPES al 5%) con inhibidor de proteasas (de 0,5 a 1 ml, según el tamaño de la muestra) (Complete TM, Boehringer Mannheim UK).
- Con el movimiento del émbolo (20 veces) se fue homogeneizando el tejido hasta reducirlo a una solución líquida.
- Se reservó una alícuota de 200 μ l del y el resto del volumen se utilizó para obtener los sinaptosomas.

2. Obtención de sinaptosomas

- El volumen separado fue sometido a una centrifugación de 1000 G durante 5 minutos a 4°C.
- Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo y se volvió a centrifugar a 15000 G durante 15 minutos, también en frío.
- Se resuspendió el sedimento obtenido (sinaptosomas crudos) en tampón fosfato salino a pH = 7, que lleva disuelto un cóctel de inhibidores de proteasas y se almacenó a -80° C para posteriores determinaciones bioquímicas.

6.3.2. Valoración de proteínas

Para conocer la concentración de proteínas de cada muestra se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), un ensayo de unión basado en el cambio diferencial de coloración producido cuando el compuesto Azul brillante de Coomassie (o reactivo de Bradford) reacciona con los residuos aminoacídicos de las proteínas, de forma proporcional a su concentración.

Para determinar la concentración de proteínas de cada muestra se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo cóncavo (Daslab, España).

- Se cargaron 10 μ l de un estándar de concentraciones crecientes de albúmina, en un rango de 25 a 300 μ g/ml (Bio-RAD Protein Assay, Cat 500-0006) para obtener una curva patrón.
- Se cargaron 10 μ l por pocillo de cada una de las muestras problema.

- Se añadieron 190 µl del reactivo de Bradford (Bio-RAD) previamente diluido 1:5 en agua y filtrado tres veces.
- Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se procedió a la lectura colorimétrica en un lector de microplacas (Digiscan, Asys Hitech GmbH) utilizando un filtro de longitud de onda de 595 nm.

La concentración de las proteínas de cada muestra se consigue interpolando el valor de la absorbancia en la curva patrón obtenida de las concentraciones conocidas de albúmina.

6.3.3. Técnica de ELISA para la determinación de los niveles de moléculas tejido cerebral: MR, GR, NCAM, PSA-NCAM, FGF y FGFR-1

La técnica de ELISA se basa en el reconocimiento específico de un antígeno a determinar por un anticuerpo primario que, a su vez, es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado con la actividad enzimática de tipo peroxidasa (POD). Dicha reacción enzimática actúa sobre el agua oxigenada (H_2O_2) presente en el tampón produciendo agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2). Este último oxida el sustrato de la reacción, el ortofenilendiaminofosfato (OPD) produciendo una reacción colorimétrica que, además, se ve favorecida por el pH ácido del medio (la actividad catalasa y peroxidasa es óptima en un rango de pH comprendido entre 4,5-5,2). Finalmente, la intensidad de la reacción colorimétrica se cuantifica por espectrofotometría mediante la lectura de la absorbancia a 492 nm de longitud de onda en el lector de microplacas.

Las placas utilizadas son de 96 pocillos (Falcon).

El protocolo que seguimos en nuestro laboratorio es el siguiente:

DIA 1º:

- Se cubrieron las paredes de los pocillos con un tampón de 'revestimiento' formado por carbonato/bicarbonato sódico 0,1 M (pH=9,6), y se dejó a temperatura ambiente durante al menos 90 minutos.
- Se dejaron secar las placas durante al menos una hora.

- El antígeno se diluyó en tampón fosfato salino (PBS) hasta llegar a una concentración de 10 µg/ml, a partir de los datos obtenidos en la valoración anterior.
- Se dejó incubando toda la noche en una cámara humidificada a 4° C.

DIA 2°:

- Se lavó 3 veces con solución de lavado (PBST), constituida por tampón fosfato salino 0,1 M y un 25% de Tween 20. Se secaron bien las placas.
- Se añadieron 100 µl de solución de bloqueo en cada pocillo, la cual contiene solución de lavado y un 3% de albúmina bovina sérica (pH=7), para impedir la unión inespecífica del anticuerpo y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavó 3 veces y se dejó secar.
- Se añadió 50 µl del anticuerpo primario a la concentración óptima en tampón de lavado. Se incubó toda la noche en la cámara humidificada.

DIA 3°:

- Se lavaron las placas 5 veces y se dejaron secar.
- Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa disuelto en tampón de lavado a la concentración adecuada durante 2 horas a temperatura ambiente dentro de la cámara humidificada.
- Se lavaron las placas 5 veces y se dejaron secar.
- Se añadieron 50 µl por pocillo de tampón citrato (constituido por una proporción 2:1 de citrato sódico 0,1 M frente a ácido cítrico 0,1 M, pH = 4,5), que contiene el sustrato de revelado OPD (ortofenilendiaminafosfato, 1 mg/ml) y H₂O₂ (2 µl de agua oxigenada al 30% por cada 10 ml de tampón citrato). Tras 5-10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se paró la reacción colorimétrica añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 N a cada pocillo.
- Se midió la absorbancia en el lector de microplacas a una longitud de onda de 492 nm.

<i>Anticuerpo</i>	<i>[Ac 1ª]</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>[Ac 2ª]</i>	<i>Casa comercial</i>
NCAM TOTAL	1/3000	Chemicon	1/2000	Anti-rabbit IgG-POD SIGMA
PSA-NCAM	1/300	AbCam	1/1000	Anti-mouse IgM-POD SIGMA
MR	1/150	Santa Cruz Biotechnology	1/500	Anti-goat IgG-POD SIGMA
GR	1/250	Santa Cruz Biotechnology	1/500	Anti-rabbit IgG-POD SIGMA
FGF	1/500	AbCam	1/500	Anti-rabbit IgG-POD SIGMA
FGF-R1	1/1000	Chemicon	1/500	Anti-mouse IgM-POD SIGMA

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la técnica de ELISA

6.4. Estudio de la supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo: marcaje con BrdU y cuantificación de células BrdU positivas.

Para marcar las células en división se utiliza bromodeoxiuridina (BrdU), una molécula análoga de la timidina que se incorpora de forma estable y específica en el ADN durante su síntesis en la fase S de la mitosis. El ADN que ha incorporado BrdU puede ser detectado utilizando técnicas inmunohistoquímicas estándar (Christie y Cameron, 2006).

6.4.1. Protocolo de marcaje con BrdU para secciones obtenidas con vibratomo

Tres semanas después de la última inyección de BrdU, los animales fueron anestesiados (ver composición del anestésico utilizado para la adrenalectomía) y perfundidos con paraformaldehído frío al 4% en tampón fosfato 0,1M. Los cerebros fueron extraídos y post-fijados en paraformaldehído al 1% en tampón fosfato 0,1M.

Posteriormente, dichos cerebros fueron cortados en secciones coronales en un vibratomo (Leica VT1000, Leica Microsystems) y almacenadas en 10 series de cortes.

Una de cada 10 series fue tratada para detectar las células BrdU positivas.

DIA 1º:

- Las secciones previamente lavadas con TBST (tampón tris salino 0,1 M y un 25% de Tween 20) se incubaron con H₂O₂ en TBST durante 20 minutos. Se lavaron posteriormente con TBST.
- Posteriormente se incubaron 30 minutos en HCl 2M diluido 1:6 en TBS. Se lavaron con TBST.
- Las secciones se incuban toda la noche con el anticuerpo primario diluido en TBST suplementado con 10% de suero de conejo (anticuerpo monoclonal frente a BrdU; 1:600, Immunological Direct, Oxford Biotechnology, Oxfordshire, UK).

DIA 2º:

- Lavado con TBST.
- Incubación con el anticuerpo secundario diluido en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente (anticuerpo biotinilado IgG anti rata; 1:500; Vector Laboratories, USA).
- Tras lavarse con TBST las secciones se incubaron con un complejo avidina-biotina (Elite Vectastain, ABS-peroxidase Kit, Vector Laboratories, USA) y teñidas con diaminobencidina (DAB, Sigma).
- Las secciones se montaron sobre portaobjetos y se dejan secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

DIA 3º:

- Los cortes se tiñeron con Violeta de Cresilo para visualizar los cuerpos celulares. Se montaron los cubreobjetos y se dejaron secar al menos 30 minutos antes de verlos al microscopio.

6.4.1. Marcaje y cuantificación de células BrdU positivas

En cada sección, se contaron manualmente el número total de células BrdU-positivas que poseían una morfología nuclear típica de neurona utilizando un objetivo de 60x (Leica). Las células positivas de la capa granular y subgranular del giro dentado del hipocampo y del hilus, fueron contadas rostro – caudalmente, excluyendo aquellas que se

encontraban fuera del plano focal. El resultado fue multiplicado por 10 para obtener el número total estimado de células inmunoreactivas por área.

6.4.2. Cuantificación de células granulares mediante estereología

El número total de células granulares en el giro dentado fue determinado utilizando el método de fraccionamiento óptico mediante el programa Stereoinvestigator (MicroBrightField, Williston, VT). Para cada sección, las células granulares fueron cuantificadas utilizando un objetivo de 60x para aceite de inmersión, en áreas de 15x15 μm espaciadas por intervalos x-y de 330x300 μm asignadas por el programa al azar dentro del área delimitada manualmente. El grosor de la sección fue estimado automáticamente por el programa.

6.5. Estimación del volumen total del hipocampo y del giro dentado.

Para ello se utilizaron secciones seriadas teñidas con Violeta de Cresilo. Los volúmenes se calcularon de acuerdo con el estimador de Cavalieri utilizando el programa Stereoinvestigator con los mismos parámetros descritos anteriormente.

6.6. Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas en CA1 del hipocampo

6.6.1. Inyecciones intracelulares de Amarillo Lucifer

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital (0,04 mg/kg) y fueron perfundidas transcardíacamente con 100 ml de salino seguido de 300 ml de paraformaldehído al 4% (0,1M, pH 7,4) en tampón fosfato 0,1M.

Los cerebros fueron extraídos del cráneo, codificados y post fijados en la misma solución durante 24 horas.

Utilizando un vibratomo, se realizaron secciones coronales de 150 μm que fueron pre-marcadas con 10-5 M 4-6 diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma D9542).

El método de inyección celular consistió en inyectar individualmente células del

tercio posterior del hipocampo dorsal izquierdo (anteroposterior -3.8 to -4.3 mm desde Bregma (Paxinos y Watson, 1982) con Amarillo Lucifer al 4% (CH, Aldrich) en LiCl 1M (pH 7,4) (Lacaille y cols, 1987) mediante el paso de una corriente estable hiperpolarizada a través del electrodo (0,5 a – 1,0 nA). Dicha corriente se aplicó hasta que el extremo distal de cada neurona quedó fluorescente.

Este protocolo ha sido descrito en más detalle en varios trabajos previos (Buhl y Schlote, 1987; Einstein, 1988; Elston y cols, 1997).

6.6.2. Procesamiento del tejido

Tras la inyección, las secciones fueron procesadas con un anticuerpo frente a Amarillo Lucifer (1:400000 en solución de conservación (2% albúmina de suero bovino (Sigma A3425), % Tritón X-100 (BDH 30632), 5% sucrosa en tampón fosfato 0,1M).

Después, se aplicó el anticuerpo secundario Alexa 488 (Chemicon, 1:1000) durante 4 horas.

Las secciones se montaron en portaobjetos con reactivo ProLong Gold (Invitrogen, Eugene, OR) y se dejaron durante 24 horas en una sala oscura a temperatura ambiente hasta que el medio de montaje hubiera solidificado.

6.6.3. Cuantificación de la densidad de espinas

Las dendritas se trazaron con ayuda del programa Neurolucida (Neurolucida 7,1; MicroBrightfield, Inc., Williston, VT) acoplado a un microscopio Olympus (BX51), utilizando un objetivo de 100x (Oil, NA 1,30, distancia de trabajo 60 μ m).

En el experimento se cuantificaron las dendritas apicales y basales del área CA1 del hipocampo (localizadas en el *stratum radiatum* y en el *stratum oriens*, respectivamente).

La densidad de espinas dendríticas de las neuronas del área CA1 se determinó trazando para cada neurona (5 neuronas de cada rata), una dendrita basal con todas sus ramas y dos dendritas oblicuas apicales con todas sus ramas, hasta los extremos distales, marcando las espinas durante el trazado. Se incluyeron todas los tipos de espinas en el conteo y no se utilizaron factores de corrección.

Los datos fueron exportados al programa Neurolucida Explorer (MicroBrightField Inc., Williston, VT) para realizar el análisis cuantitativo.

La densidad de espinas fue calculada en cada nivel de ramificación tanto para dendritas apicales como basales, dividiendo el número de espinas de cada segmento por la longitud de dicho segmento.

7. Análisis estadísticos

Todos los resultados se presentan como la media \pm error estándar.

Para evaluar la normalidad de los grupos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para muestras normales, la comparación de más de dos grupos se llevó a cabo usando análisis de varianza (ANOVA) de doble vía o de una vía (según procediera), seguidos por pruebas de comparaciones *a posteriori* como el *test* de Tukey y el *test* de Dunnet. En el caso de que los grupos muestrales no se distribuyeran normalmente, se realizaron *test* no-paramétricos como el *Kruskal-Wallis*. Para la comparación de dos grupos entre sí, se aplicó el *test t* de Student o bien la prueba de Mann-Whitney. Para estudiar la posible existencia de correlaciones, se utilizó el *test* de Pearson. La significación se aceptó cuando $p < 0,05$.

8. Diseño experimental

Caracterización del modelo de ansiedad y estudio de la vulnerabilidad al daño inducido por el estrés crónico y/o asociado al envejecimiento

Una vez que los animales llegaron al animalario se les dejó dos semanas de aclimatación, y, posteriormente, se evaluaron sus niveles de ansiedad en el LCE. Los animales fueron clasificados en tres grupos experimentales, en función del tiempo que

permanecieron en los brazos abiertos del aparato, de modo que los grupos extremos diferían 2 veces la desviación estándar por encima o por debajo del valor medio de ansiedad obtenido para el grupo de intermedios.

Una semana después de su evaluación en el LCE, se procedió a realizar las diferentes pruebas conductuales.

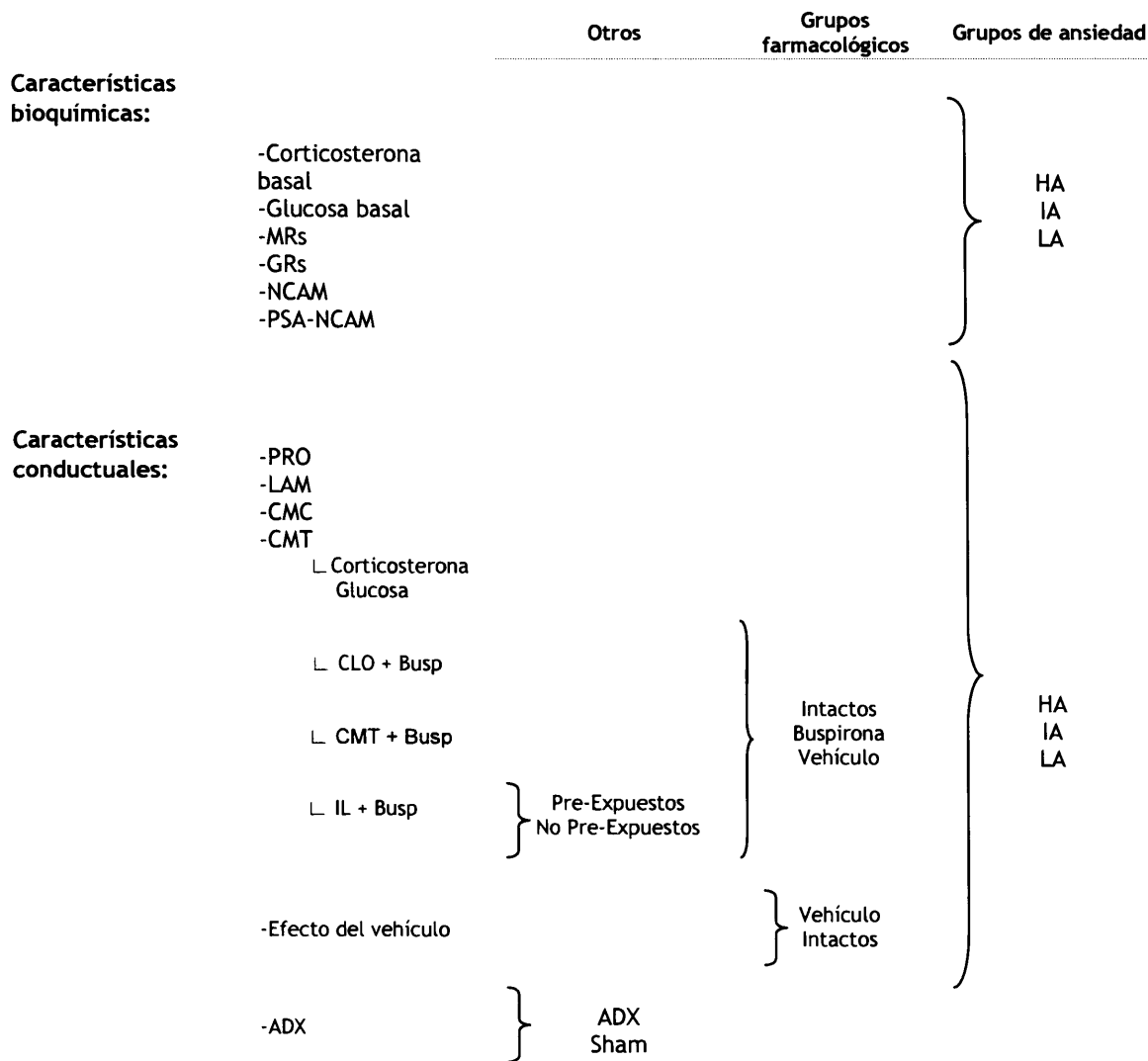
8.1. Caracterización del modelo de ansiedad

En primer lugar se evaluaron distintos parámetros bioquímicos y conductuales, con el fin de establecer las diferencias basales que pudieran existir entre los grupos de ansiedad en los que dividimos cada lote de animales atendiendo a su reactividad medida en el LCE.

- Animales muy ansiosos o HA (del inglés *high anxiety*)
- Animales de ansiedad intermedia o IA (del inglés *intermediate anxiety*)
- Animales poco ansiosos o LA (del inglés *low anxiety*)

Grupos experimentales: (ver Esquema 2)

Material y Métodos



Esquema 2. Grupos experimentales correspondientes al apartado 8.1.

8.1.1. Características bioquímicas

- Niveles basales de corticosterona en plasma medidos mediante la técnica de RIA
- Niveles basales de glucosa en plasma
- Niveles basales de receptores cerebrales tanto en hipocampo como en corteza, medidos mediante la técnica de ELISA:
 - GRs
 - MRs
 - NCAM
 - PSA-NCAM

Estos valores de receptores cerebrales se obtuvieron del lote utilizado como control del estrés en animales jóvenes. Esto nos permitió optimizar el número de ratas usadas en este trabajo, ya que el diseño de los grupos experimentales nos obligaba a manejar un número de animales muy elevado por experimento, con los problemas que esto supone a nivel ético y práctico.

8.1.2. Características conductuales y cognitivas

Los animales utilizados para estudiar el aprendizaje y la memoria espacial tanto en el LAM como en la PRO en condiciones basales pertenecen al grupo 'Control' que se dejarían envejecer en paralelo a los animales estresados de la segunda parte de este trabajo (ver Esquema 5).

El resto de experimentos se llevó a cabo con lotes independientes de animales tal y como puede comprobarse en el Esquema 4.

Todos los animales fueron clasificados previamente en el LCE.

Las baterías de pruebas conductuales llevadas a cabo fueron:

- ***Efecto del rasgo de ansiedad en el laberinto acuático de Morris (LAM):***
 - 2 días de entrenamiento: 120 segundos por ensayo
 - Prueba de memoria 24 horas después: 90 segundos

- ***Efecto del rasgo de ansiedad en la prueba de reconocimiento de objetos (PRO)***
 - Habitación: 5 días/5 minutos
 - Entrenamiento: 30 segundos de exploración de los objetos – 3 minutos máximo
 - Prueba de memoria: 3 minutos
- ***Efecto del rasgo de ansiedad en el condicionamiento de miedo al contexto (CMC)***
 - Entrenamiento
 - Prueba de memoria 24 horas después del entrenamiento
 - Extinción de la memoria 1 semana después: 3 sesiones consecutivas
- ***Efecto del rasgo de ansiedad en el condicionamiento de miedo al tono (CMT)***
 - Entrenamiento
 - Prueba de memoria 48 horas después del entrenamiento
- ***Evaluación de los niveles de corticosterona y glucosa tras el entrenamiento del CMT***
 - Entrenamiento
 - Extracción de sangre de la cola inmediatamente después del entrenamiento
- ***Modulación del estado de ansiedad tras la administración de buspirona***
 - Inyección subcutánea de buspirona
 - Evaluación de la ansiedad en la CLO una hora después del tratamiento
- ***Modulación de la memoria emocional en el CMT tras la administración de buspirona antes del entrenamiento***
 - Inyección subcutánea de buspirona
 - Entrenamiento
 - Prueba de memoria 48 horas después del entrenamiento
 - Reevaluación de la memoria una semana después de la última prueba de memoria
- ***Estudio del efecto de la administración de vehículo (salino) en los niveles de corticosterona y glucosa***
 - Inyección subcutánea de vehículo
 - Extracción de sangre de la cola una hora después de la inyección
- ***Efecto de la adrenalectomía en la ansiedad y en el CMT***
 - Adrenalectomía de los animales

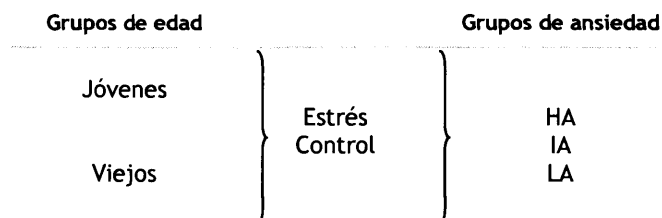
- Evaluación en la CLO tras 10 días de recuperación post-operatoria
- Entrenamiento del CMT
- Prueba de memoria emocional 48 horas después del entrenamiento
- Reevaluación de la memoria emocional una semana después de la última prueba de memoria
- Extracción de sangre de la cola inmediatamente después de la prueba de memoria
- ***Estudio del efecto de la ansiedad en el fenómeno de inhibición latente y su modulación mediante la administración de buspirona***
 - Administración de los tratamientos
 - Pre-exposición al tono una hora después del tratamiento
 - Entrenamiento 24 horas después de la pre-exposición
 - Prueba de memoria 48 horas después del entrenamiento

8.2. Efecto del rasgo de ansiedad en la vulnerabilidad al estrés y al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento

En esta segunda parte, quisimos estudiar si las diferencias basales que habíamos encontrado, tanto a nivel conductual como bioquímico, hacía que los animales HA, IA y LA difirieran fisiológicamente en sus respuestas a un protocolo de estrés crónico impredecible, así como al efecto deletéreo del envejecimiento sobre las capacidades cognitivas de los animales y los niveles de receptores cerebrales evaluados.

Todos los animales fueron clasificados en el LCE en HA, IA y LA.

Grupos experimentales: (ver esquema 3)



Esquema 3. Grupos experimentales del apartado 8.2.

8.2.1. Características bioquímicas

Cuando finalizó el protocolo de estrés, todos los animales, tanto los estresados como los controles, fueron sacrificados para obtener la sangre del tronco y los cerebros, que fueron diseccionados en fresco para analizar en el hipocampo y la corteza prefrontal los niveles de:

- Niveles de corticosterona en plasma medidos mediante la técnica de RIA:
 - Extracción de sangre de la cola el primer día del ECI (grupo E-J)
 - Extracción de sangre de la cola tras una semana de ECI después de la plataforma elevada (grupo E-J)
 - Extracción de sangre de la cola la tercera semana del ECI a tres tiempos (grupo E-V): 0 minutos (antes del estrés), tras 30 minutos de estar en el cepo, 90 minutos (una hora después de haber salido del cepo). Al grupo E-C se les sacó sangre a los mismos tiempos.
 - Obtención de sangre del tronco tras el sacrificio
- Niveles basales de receptores cerebrales tanto en hipocampo como en corteza, medidos mediante la técnica de ELISA:
 - GRs
 - MRs
 - NCAM
 - PSA-NCAM
 - FGF
 - FGF-R1

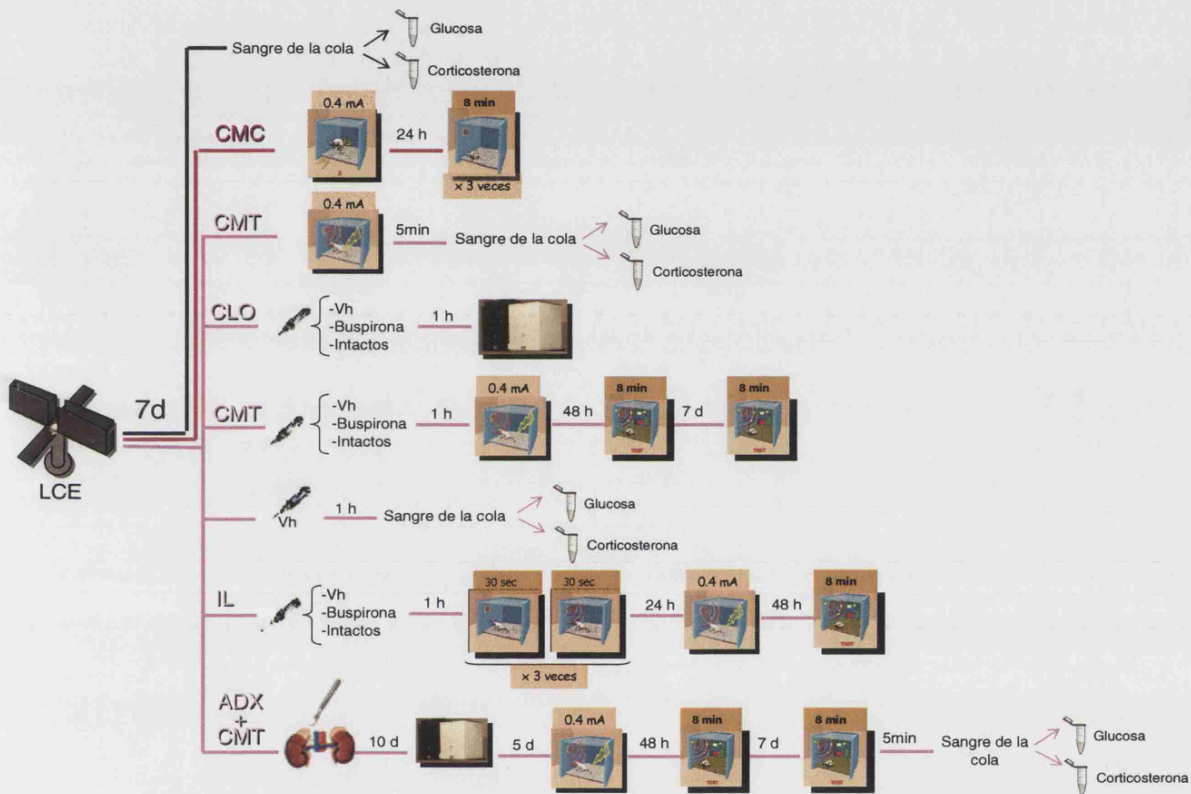
8.2.2. Características conductuales y cognitivas

El grupo experimental 'Joven' no fue sometido a ninguna prueba conductual para evitar que el aprendizaje pudiera modular la expresión de alguna de las moléculas anteriormente mencionadas. Solamente se les sacó sangre de la cola a los animales estresados el primer día del estrés, cuya prueba consistió en un entrenamiento de CMT (valores que nos servirían para obtener los niveles de corticosterona implicados en dicho paradigma), y a la segunda semana del estrés tras 1 hora en la plataforma elevada.

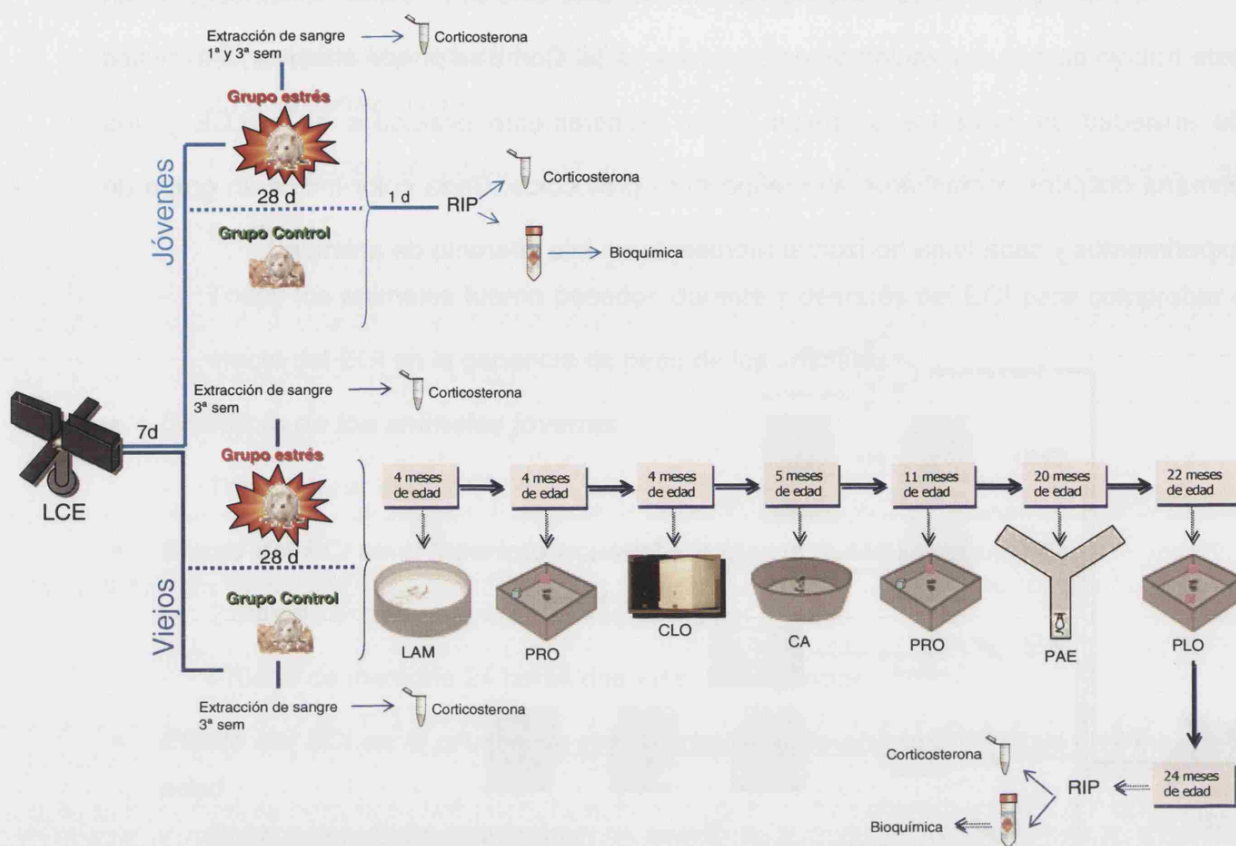
El diseño experimental llevado a cabo fue el siguiente

- ***Estrés crónico impredecible (ECI)***
 - 28 días consecutivos
 - Recordatorios de estrés 1 vez al mes al grupo de animales estresados que se dejó envejecer
 - Todos los animales fueron pesados durante y después del ECI para comprobar el efecto del ECI en la ganancia de peso de los animales
- ***Sacrificio de los animales jóvenes***
 - Tras finalizar el ECI
- ***Efecto del ECI en el laberinto acuático de Morris (LAM): 3 meses***
 - 2 días de entrenamiento: 120 segundos por ensayo
 - Prueba de memoria 24 horas después: 90 segundos
- ***Efecto del ECI en la prueba de reconocimiento de objetos (PRO): 4 y 11 meses de edad***
 - Habitación: 5 días/5 minutos
 - Entrenamiento: 30 segundos de exploración de los objetos – 3 minutos máximo
 - Prueba de memoria: 3 minutos
- ***Reevaluación de los niveles de ansiedad: 5 meses de edad***
 - Caja luz-oscuridad: 5 minutos
 - Campo abierto dos semanas después de la CLO: 10 minutos
- ***Efecto del estrés crónico en la prueba de alternancia espontánea (PAE): 20 meses de edad***
 - 5 minutos
- ***Efecto del estrés crónico en la prueba de localización de objetos (PLO): 22 meses de edad***
 - Habitación: 5 días/5 minutos
 - Entrenamiento 24 horas después de la habitación: 3 minutos
 - Prueba de memoria 8 minutos después del entrenamiento: 3 minutos
- ***Sacrificio de los animales viejos: 24 meses***

En el siguiente esquema puede comprobarse el diseño experimental seguido en este trabajo para la realización de esta primera parte. Como se puede observar, los niveles de ansiedad de todos los animales fueron primeramente evaluados en el LCE y una semana después comenzaron sus respectivos protocolos. Cada color indica un grupo de experimentos y cada línea horizontal representa un lote diferente de animales.



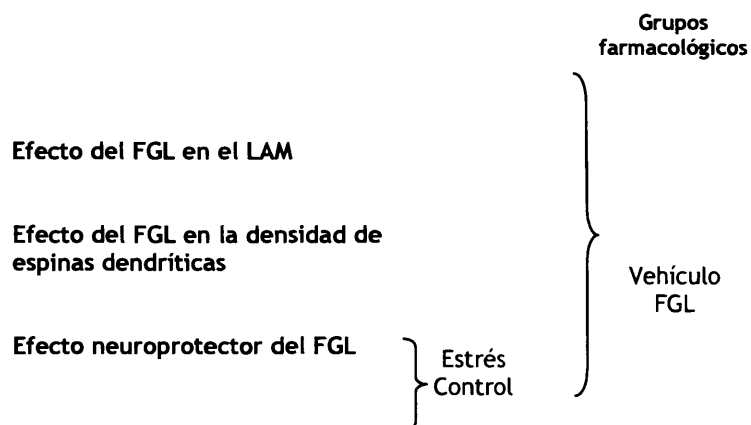
Esquema 4. Diseño experimental de la Primera Parte: caracterización del modelo de ansiedad LCE (laberinto en cruz elevado), CMC/T (condicionamiento del miedo al contexto/al tono), IL (inhibición latente), ADX (adrenalectomía), Vh (vehículo)



Esquema 5. Diseño experimental de la Primera Parte: Efecto del rasgo de ansiedad en la vulnerabilidad al estrés y al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento
LCE (laberinto en cruz elevado), LAM (laberinto acuático de Morris), PRO (prueba de reconocimiento de objetos), CLO (caja luz-oscuridad), PAE (prueba de alternancia espontánea), PLO (prueba de localización de objetos).

Estudio del efecto del FGL sobre el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica. Posible papel neuroprotector frente al daño inducido por el estrés crónico.

Grupos experimentales: (ver esquema 6)



Esquema 6. Grupos experimentales correspondientes al apartado 2

8.3. Efecto del FGL en el aprendizaje y la memoria espacial

En esta parte evaluamos el efecto de la administración subcutánea de FGL, un péptido mimético de NCAM, en el aprendizaje y la memoria espacial en el LAM.

El protocolo seguido fue:

- **Administración del tratamiento:** 5 y 2 días antes del LAM
- **Efecto del FGL en el LAM**
 - Entrenamiento: 4 ensayos de 120 segundos durante dos días
 - Prueba de memoria: 24 horas tras el entrenamiento se realizó un ensayo de 90 segundos

8.4. Efecto de la administración de FGL sobre el número de espinas dendríticas en CA1 del hipocampo

Puesto que se piensa que las espinas dendríticas se encuentran mediando la plasticidad sináptica que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria (Hayashi y

Majewska, 2005), estudiamos el posible efecto del tratamiento con FGL sobre la densidad de espinas en el hipocampo.

El protocolo seguido fue:

- **Administración del tratamiento:** 5 y dos días antes del sacrificio
- **Sacrificio de los animales**
- **Realización de técnicas bioquímicas para el marcaje y cuantificación de espinas dendríticas**

8.5. El FGL previene el daño cognitivo inducido por estrés y asociado al envejecimiento

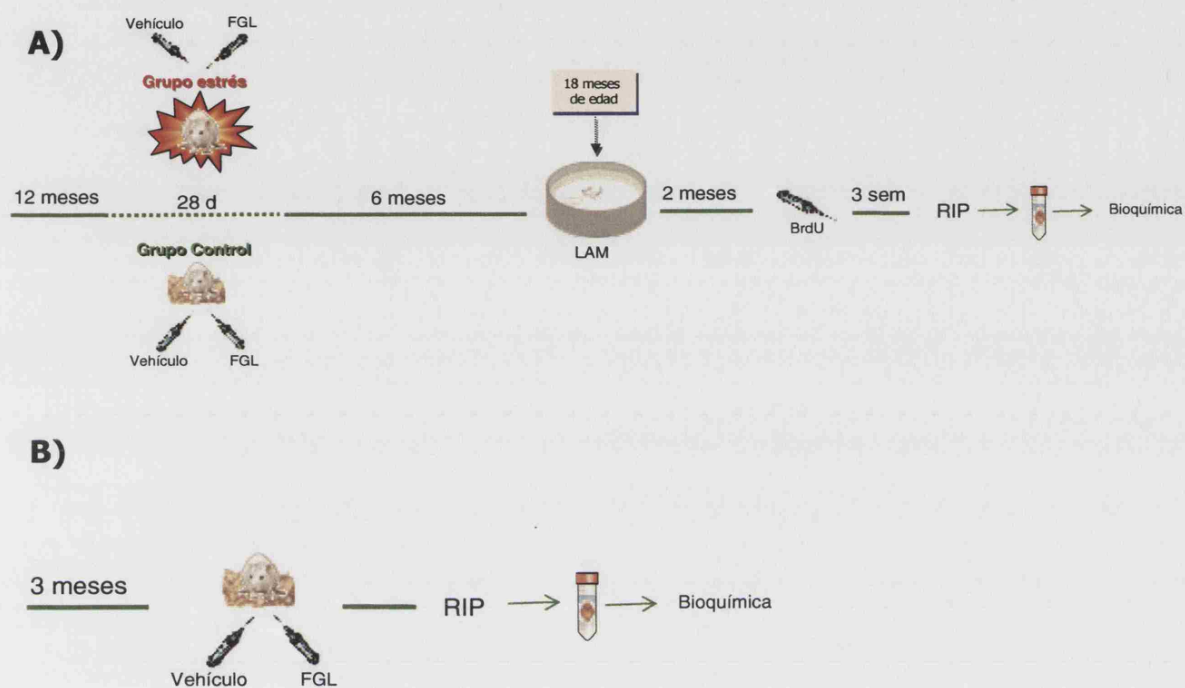
Una vez comprobado que el FGL era capaz de mejorar las capacidades de aprendizaje, quisimos comprobar si la administración del mismo durante un paradigma de ECI en la edad adulta era capaz de prevenir las alteraciones cognitivas y/o moleculares asociadas al mismo cuando estos animales llegaban a la vejez.

El diseño experimental fue el siguiente:

- **ECI: 12 meses de edad**
 - 28 días
 - Administración del tratamiento 2 veces por semana
 - Recordatorios de estrés cada 15 días a los animales estresados
 - Todos los animales fueron pesados durante y después del ECI para comprobar el efecto del ECI en la ganancia de peso de los animales
- **Estudio del efecto neuroprotector del FGL en el LAM: 18 meses de edad**
 - Entrenamiento: 3 días, 3 ensayos cada día de 90 segundos
 - Prueba de memoria: 24 horas tras el entrenamiento se realizó un ensayo de 60 segundos
- **Administración de BrdU**
 - 3 semanas después del LAM
- **Perfusión de los animales**
 - 3 semanas después

▪ **Análisis inmunohistoquímico de los cerebros**

A continuación se muestra un esquema del diseño experimental de esta segunda parte.



Esquema 7. Diseño experimental de la Segunda Parte. A) Prevención del daño cognitivo inducido por el estrés crónico. B) Efecto del FGL sobre la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo. LCE (laberinto en cruz elevado), LAM (laberinto acuático de Morris).

IV. Resultados

1. Caracterización del modelo de ansiedad y estudio de la vulnerabilidad al daño inducido por el estrés crónico y/o asociado al envejecimiento

1.1. Caracterización del modelo de ansiedad

Antes de iniciar cada abordaje experimental los animales fueron clasificados en función del tiempo que permanecieron en los brazos abiertos del aparato en HA, IA y LA.

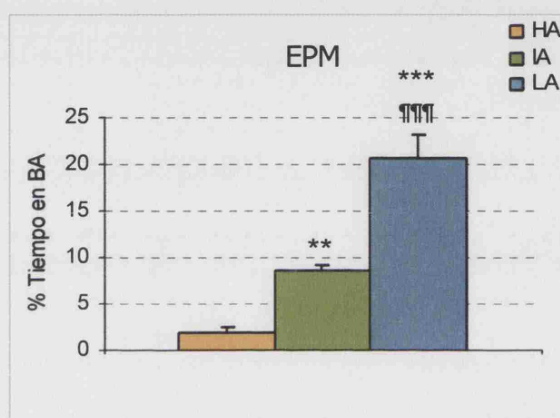


Figura 12. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del EPM. HA(10), IA (10), LA (11). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs HA, **** $p < 0,001$ vs IA.

En la Figura 12 se muestra un ejemplo de cómo se comportan los tres grupos de ansiedad de los que partimos para cada experimento en el LCE. Como se observa, tanto los LA como los IA difieren significativamente de los HA ($F_{2,28}=39,48$, $p < 0,001$), lo que fue confirmado por el análisis *a posteriori* (LA-HA, $p < 0,001$; LA-IA, $p < 0,001$; IA-HA, $p = 0,007$).

1.1.1. Características bioquímicas

➤ Niveles basales de corticosterona

A los animales previamente clasificados por su ansiedad se les extrajo sangre de la cola para analizar sus niveles basales de corticosterona.

El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los niveles de corticosterona de los grupos de ansiedad ($F_{2,51}=15,138$, $p < 0,001$). El análisis *a posteriori* confirmó que la corticosterona de las ratas LA era significativamente mayor que las de las ratas HA ($p = 0,001$) y que la de las ratas IA ($p = 0,001$), no habiendo diferencias entre estos dos últimos.

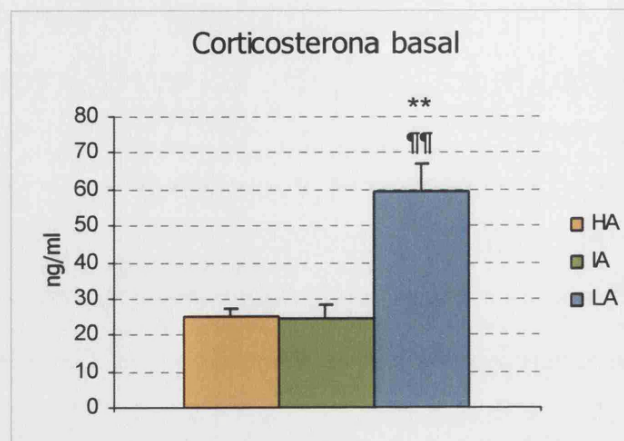


Figura 13. Niveles de corticosterona basales. HA(17), IA (16), LA (19). ** $p=0,001$ LA vs HA, $***p<0,001$ LA vs IA.

Al hacer la regresión entre la cantidad de corticosterona medida y el porcentaje de tiempo que las ratas pasaron en los brazos abiertos del LCE, parámetro que se utiliza para clasificarlas en HA, IA o LA, se obtuvo una correlación positiva altamente significativa ($r=0,5482$, $p<0,001$), indicando que los animales que tuvieron un comportamiento menos ansioso en el LCE, es decir, pasaron un mayor porcentaje de tiempo los brazos abiertos, presentaban una mayor concentración de corticosterona circulante en condiciones basales.

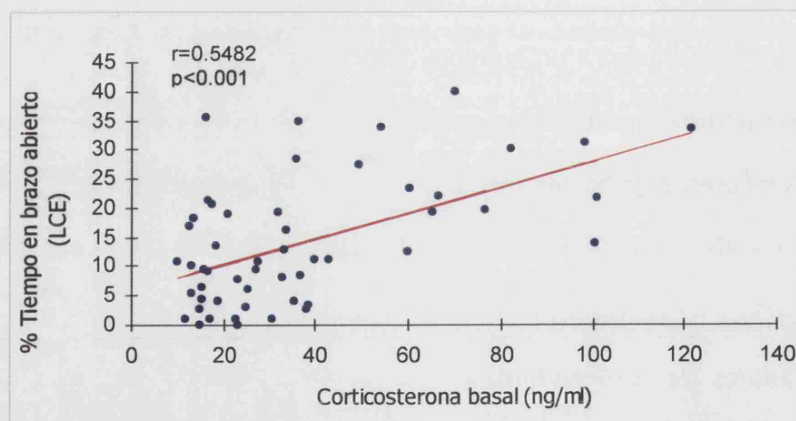


Figura 14. Correlación entre el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del LCE y los niveles plasmáticos de corticosterona en condiciones basales.

➤ Niveles basales de glucosa

Los niveles de glucosa fueron medidos inmediatamente después de realizar el corte en la cola. El ANOVA no encontró diferencias significativas entre los tres subgrupos de animales al analizar este parámetro ($F_{2,29}=0,45$, n.s.).

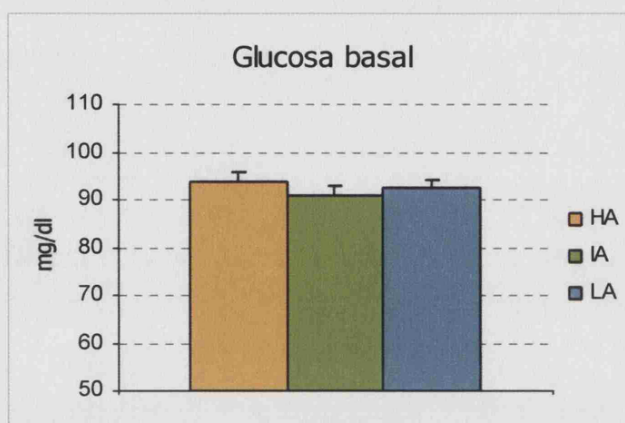


Figura 15. Niveles basales de glucosa en plasma. HA (10), IA (10), LA (10).

➤ **Niveles basales de GRs, MRs, NCAM y PSA-NCAM**

Como ya se ha explicado en el diseño experimental (ver página 105), estos valores corresponden al lote de animales que a su vez sirve de control para el grupo de animales jóvenes estresados, pero aportan también un dato más a la hora de caracterizar fisiológicamente nuestro modelo de ansiedad como paso previo al estudio exhaustivo de sus capacidades de aprendizaje y memoria y la modulación tanto conductual como a nivel cerebral de distintas situaciones como el estrés crónico o el envejecimiento.

• **Hipocampo**

Con respecto a los datos obtenidos a partir de homogenados de hipocampo, no se han encontrado diferencias significativas entre los grupos ni en los niveles de MR ($F_{2,27}=1,33$, n.s.), ni en los de NCAM ($F_{2,28}=1,56$, n.s.) o PSA-NCAM ($F_{2,29}=1,16$, n.s.) (ver la Figura 15). Únicamente se observó una tendencia en los valores de GRs a que los animales LA expresen más receptores de glucocorticoides en el hipocampo que los HA ($F_{2,29}=3,24$; $p=0,055$). Cuando comparamos únicamente los extremos de la población, la tendencia entre HA y LA se hace significativa ($p=0,043$) en cuanto a la expresión de GRs en el hipocampo.

• **Corteza frontal**

Aunque los niveles de MRs en la corteza frontal no se vieron afectados por la ansiedad, el ANOVA indicó una tendencia a que los animales más ansiosos expresaran mayor cantidad de receptor de mineralocorticoides que los IA ($F_{2,27}=3,11$; $p=0,062$). En el

Resultados

caso de NCAM también hay una tendencia a la significación ($F_{2,29}=2,99$; $p=0,067$), siendo los animales HA los que mostrarían niveles mas bajos de NCAM en comparación con los LA. Cuando comparamos únicamente los extremos de la población dicha la tendencia entre HA y LA se hace significativa ($p=0,012$). Con respecto a los valores de PSA-NCAM no aparecieron diferencias en la expresión de esta molécula en función de los niveles de ansiedad de los animales ($F_{2,29}=1,52$; n.s.).

Hipocampo

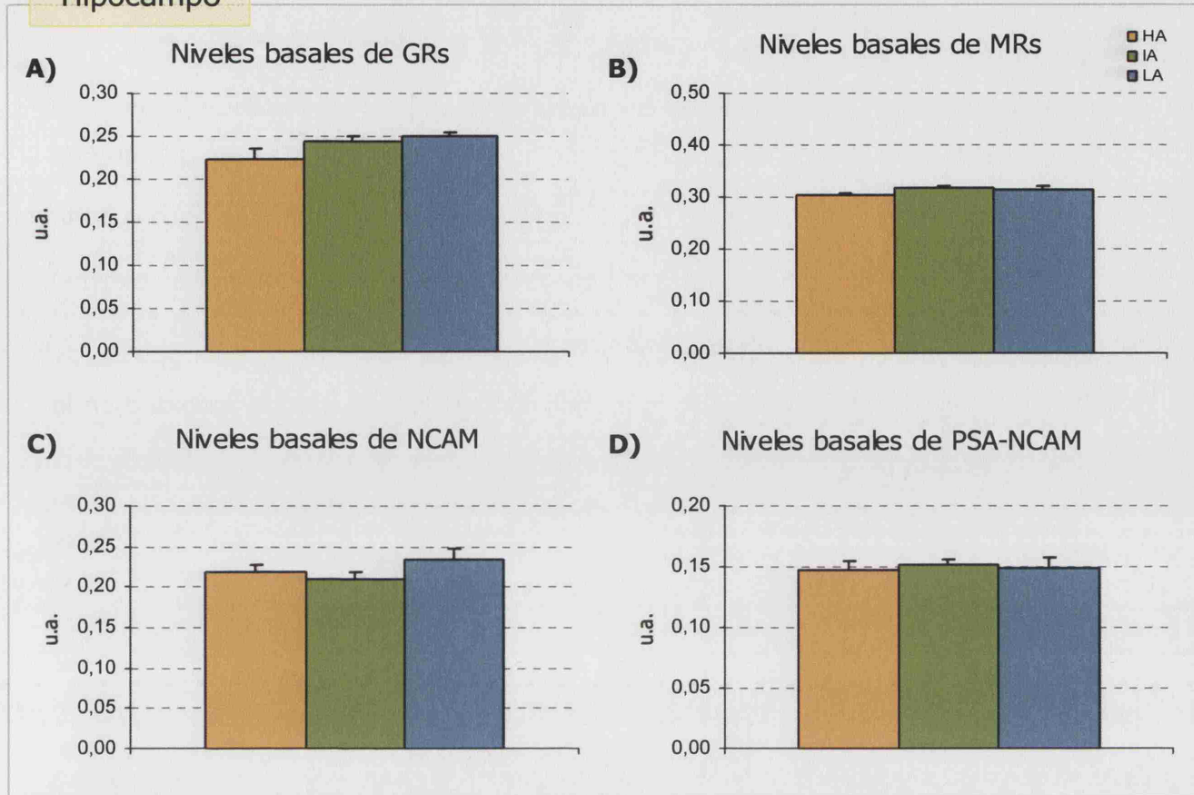


Figura 15. Niveles de receptores hipocampales. A) Niveles de GRs (HA=10, IA=11, LA=9); B) Niveles de MRs (HA=9, IA=10, LA=10); C) Niveles de NCAM (HA=9, IA=10, LA=10); D) PSA-NCAM (HA=9, IA=11, LA=10).

Corteza

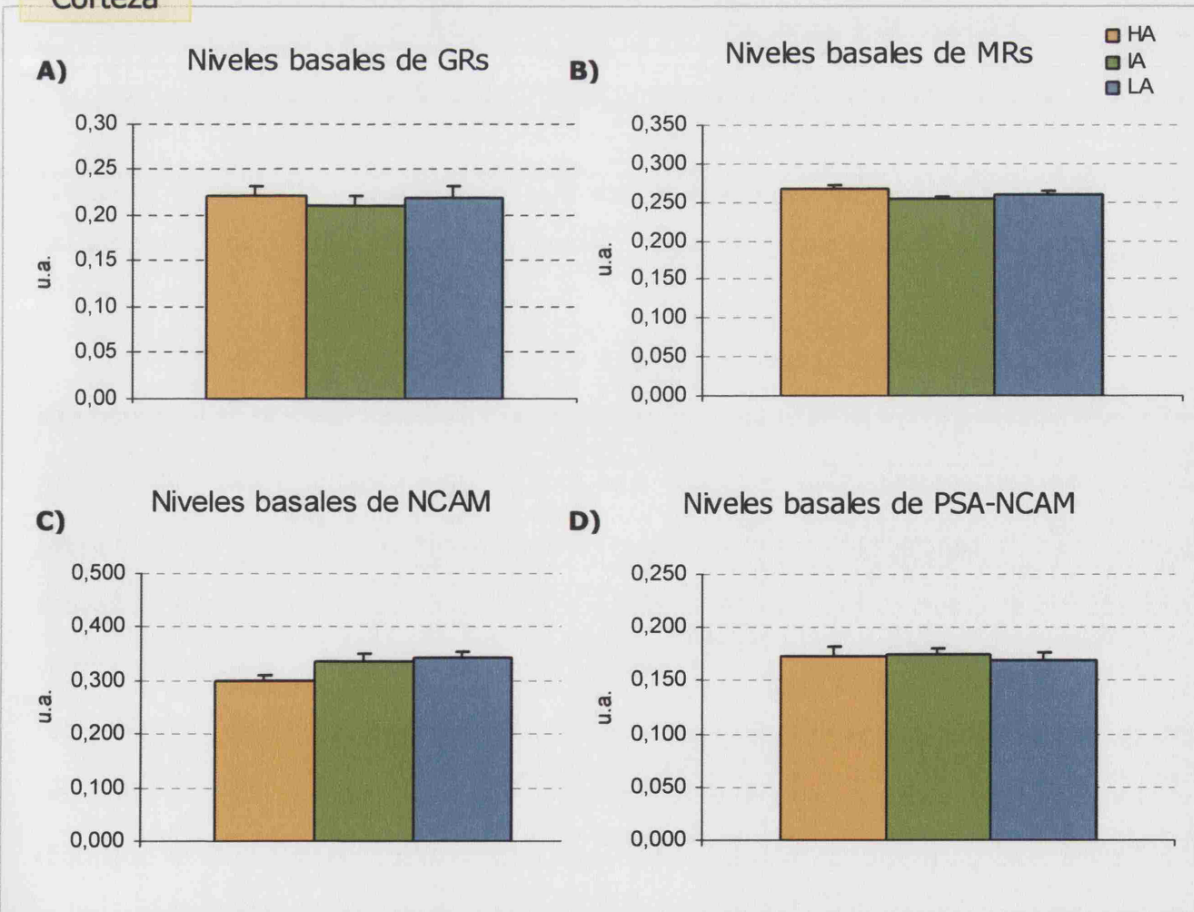


Figura 16. Niveles de receptores corticales. A) Niveles de GRs; B) Niveles de MRs (HA=8, IA=11, LA=10); C) Niveles de NCAM (HA=10, IA=11, LA=9); D) PSA-NCAM (HA=10, IA=10, LA=10).

1.1.2. Evaluación conductual y cognitiva

➤ Efecto del rasgo de ansiedad en la prueba de reconocimiento de objetos

Una prueba dependiente de hipocampo es la PRO, en la que las ratas tienen que reconocer un objeto novedoso frente al familiar. La medida de la memoria se hace a partir del Índice de Discriminación (ID). Se considera que un ID inferior a 0,2 indica que el animal presenta un déficit a la hora de realizar dicha prueba.

El ANOVA no mostró diferencias significativas entre los grupos de ansiedad en la ejecución de esta tarea ($F_{2,30}=0,79$, n.s.).

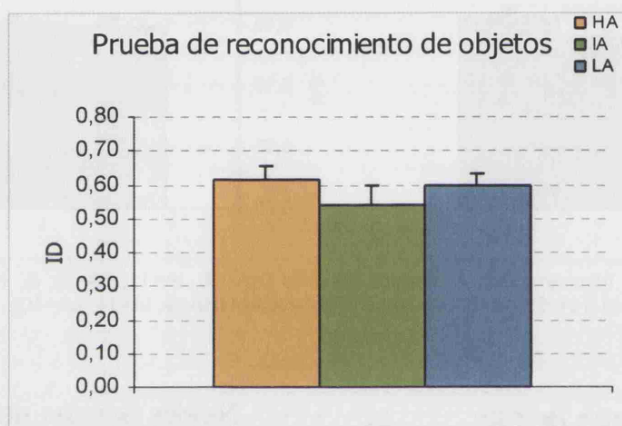


Figura 17. Índice de discriminación (ID) obtenido en la PRO. HA (10), IA (11), LA (10).

➤ Efecto del rasgo de ansiedad en LAM

Una de las pruebas más utilizadas en roedores para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial es el LAM.

- **Entrenamiento:** 3 ensayos de 120 segundos durante 2 días

El parámetro que hemos utilizado para analizar el efecto del rasgo de ansiedad en el aprendizaje espacial es la distancia recorrida por los animales hasta alcanzar la plataforma escondida en cada ensayo. El ANOVA de medidas repetidas de las distancias no evidenció un efecto de la ansiedad en el proceso global de aprendizaje a lo largo de los últimos 5 ensayos ($F_{2,29}=253,78$, n.s.). Sin embargo, es importante analizar de forma independiente el 4º ensayo, puesto que se trata del primer ensayo del segundo día de entrenamiento y puede considerarse la primera prueba de memoria. En este caso, el ANOVA mostró un efecto de la ansiedad ($F_{2,29}=4,61$, $p=0,019$), confirmando el *post-hoc* que las ratas menos ansiosas recorrieron una distancia menor que las HA ($p=0,027$) y que

las IA ($p=0,042$), y por tanto recordaban mejor la posición de la plataforma sumergida que habían aprendido el día anterior.

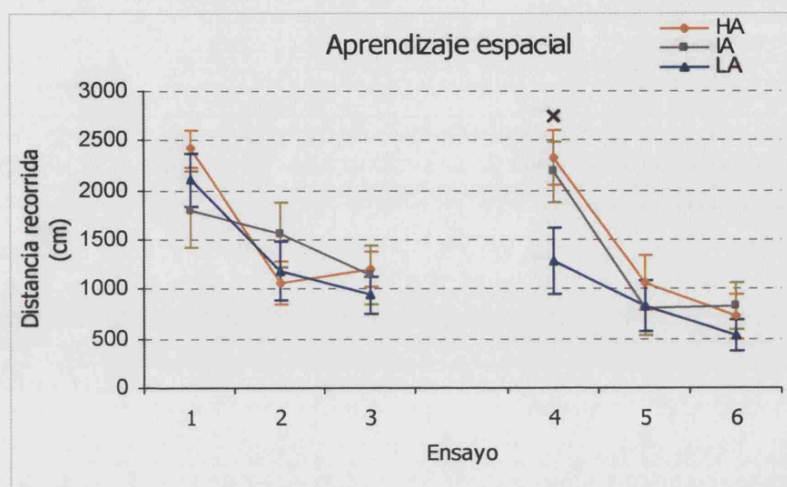


Figura 18. Distancia recorrida a la plataforma escondida durante el aprendizaje espacial en el LAM. HA (11), IA (10), LA (9)
* $p<0.05$ todos los grupos vs LA.

En el resto de los parámetros (ver Tabla 1) no se encontraron diferencias entre los grupos.

Porcentaje de tiempo en el exterior del laberinto

Grupo	Ensayo					
	1	2	3	4	5	6
HA	86,66 ± 1,80	41,14 ± 8,96	50,14 ± 8,94	74,67 ± 4,30	35,88 ± 3,84	31,11 ± 11,02
IA	73,73 ± 7,44	59,96 ± 8,31	51,47 ± 10,26	66,86 ± 7,22	30,93 ± 8,63	33,89 ± 9,84
LA	78,16 ± 4,97	51,91 ± 8,79	45,93 ± 9,94	56,11 ± 9,38	28,96 ± 10,29	17,83 ± 8,41

Tabla 2. Porcentaje de tiempo nadado en zona periférica del laberinto en el aprendizaje del LAM. Los valores representan la media ± el E.M.E. HA (11), IA (10), LA (9)

• Prueba de memoria: un ensayo de 90 segundos

No se encontraron diferencias en ninguno de los parámetros medidos, ni durante los 90 segundos que duró la prueba ni durante los 30 primeros segundos, ventana de tiempo que suele analizarse de forma independiente puesto que se ha visto que en ocasiones los animales al no localizar la plataforma tienden a cambiar de estrategia, flotando o buscando en otros lugares, por lo que los datos de los 90 segundos en ocasiones pueden resultar confusos. También se midió un área de unos 20 centímetros (denominada AP, de 'área alrededor de la plataforma') en torno a donde estaba situada la plataforma durante el entrenamiento ya que es una buena medida del recuerdo que los animales tienen de la ubicación de la misma.

Prueba de memoria – 30 segundos

Parámetro	Grupo		
	HA	IA	LA
% Tiempo en el exterior de la piscina	51,85 ± 9,76	45,75 ± 8,73	43,20 ± 11,52
% Tiempo en Q1	23,56 ± 3,19	23,13 ± 3,95	29,04 ± 5,74
% AP	4,17 ± 1,11	3,88 ± 0,93	4,93 ± 1,45
Q1/Q1+Q3	0,87 ± 0,15	1,02 ± 0,36	1,48 ± 0,47

Tabla 3. Resultados de la prueba de memoria en el LAM durante los primeros 30 segundos de prueba. Los valores representan la media ± el E.M.E. HA (11), IA (10), LA (9). Q1 es el cuadrante diana y Q3 el cuadrante opuesto a éste. AP es el área de 20 cm alrededor de la plataforma.

➤ **Efecto del rasgo de ansiedad en el CMC**

El CMC es una prueba de aprendizaje que se utiliza para evaluar la funcionalidad del hipocampo. En nuestro experimento, 24 horas después del entrenamiento los animales se reexpusieron al contexto donde habían recibido las descargas para evaluar su memoria.

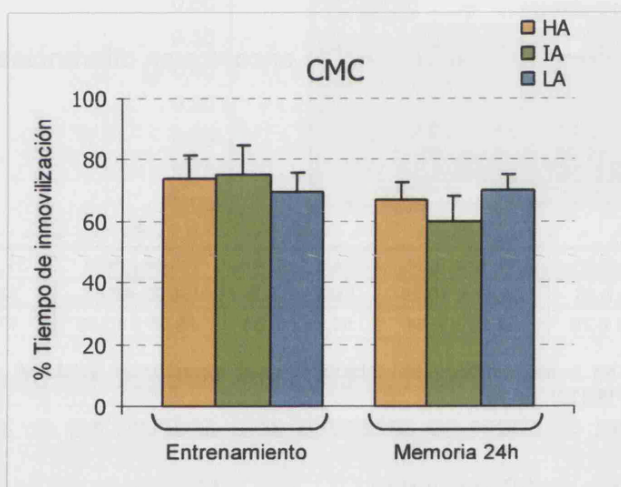


Figura 19. Porcentaje de tiempo de inmovilización en el CMC durante el entrenamiento y durante la prueba de memoria realizada 24 horas después. HA(11), IA (11), LA (11)

No se encontraron diferencias en el porcentaje de tiempo de inmovilización en el entrenamiento ($F_{2,32}=0,17$, n.s.) ni en la prueba de memoria realizada al día siguiente ($F_{2,32}=0,77$, n.s.).

Posteriormente se llevó a cabo un protocolo de extinción del condicionamiento del miedo reexponiendo a las ratas de nuevo al contexto dos veces más. Se dejó una hora de intervalo entre cada prueba para comprobar si la ansiedad intrínseca de los sujetos influía significativamente en las capacidades de los animales para reaprender que el contexto ya no era nocivo para ellos.

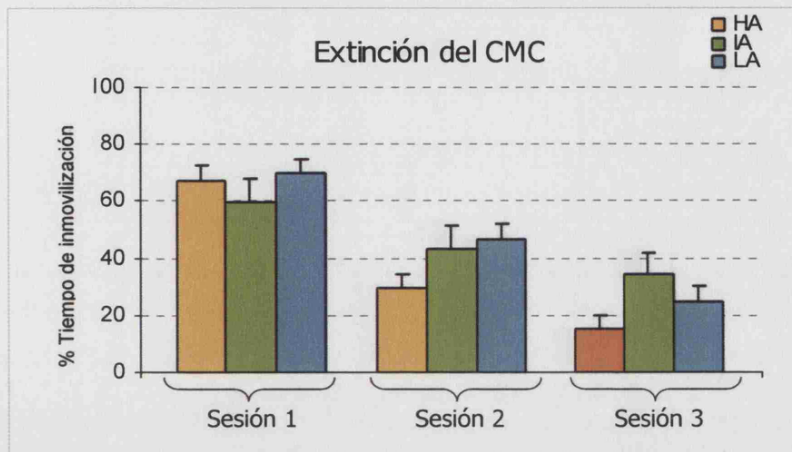


Figura 20. Porcentaje de tiempo de inmovilización durante la extinción del CMC. HA (11), IA, (11), LA (11).

El ANOVA de medidas repetidas no evidenció el efecto significativo de la ansiedad en la extinción de la conducta de miedo ($F_{2,30}=0,05$, n.s.). Sin embargo, si analizamos cada grupo de ansiedad por separado encontramos que tanto los HA ($F_{1,10}=41,02$, $p<0,001$), como los IA ($F_{1,10}=15,2$, $p=0,003$) y los LA ($F_{1,10}=27,4$, $p<0,001$) eran capaces de reaprender a lo largo de las sesiones de extinción y disminuir su respuesta de miedo en cada reexposición. Si aplicamos un ANOVA de una vía dentro de cada sesión de extinción, sólo aparece una tendencia cercana a la significación en la 3ª sesión ($F_{2,32}=2,91$, $p=0,07$).

➤ **Efecto del rasgo de ansiedad en el CMT**

Condicionamiento del miedo al tono

Tal y como se observa en la Figura 21, no hubo diferencias entre los grupos de ansiedad en el porcentaje de tiempo que los animales permanecieron inmóviles durante el entrenamiento ($F_{2,26}=0,45$, n.s.). Sin embargo en la prueba de memoria realizada 48 horas después, los animales menos ansiosos mostraron una mayor condicionamiento al tono asociado a la descarga que los animales más ansiosos ($F_{2,25}=12,30$, $p<0,001$). El análisis *a posteriori* reveló que tanto las ratas LA ($p<0,001$), como las IA ($p=0,007$) permanecieron significativamente más tiempo inmóviles que las HA.

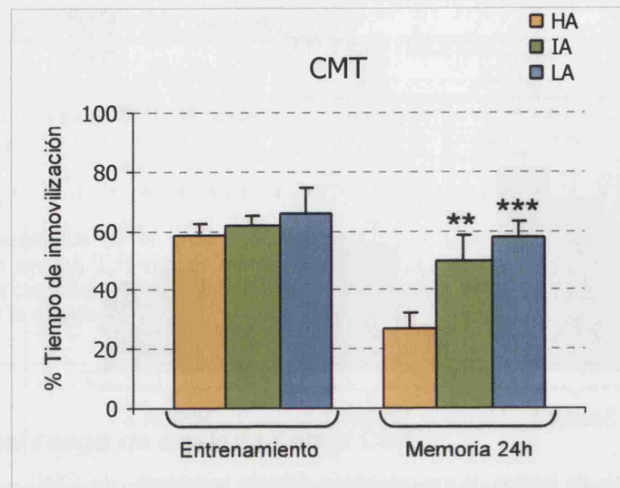


Figura 21. Porcentaje de tiempo de inmovilización durante el CMT. HA(9), IA (8), LA (10). *** $p < 0.001$ vs HA, ** $p < 0.01$ vs HA

Valoración de los niveles de corticosterona plasmática tras el entrenamiento en el CMT

A un grupo de ratas clasificadas por sus niveles de ansiedad, se les tomó sangre de la cola tras el CMT.

Los resultados obtenidos apuntaron a un efecto tanto del tiempo ($F_{3,121}=64,53$, $p < 0,001$) como de la interacción entre el efecto del tiempo y de la ansiedad ($F_{6,121}=3,71$, $p = 0,002$) sobre la liberación de corticosterona, no así de la ansiedad ($F_{2,121}=0,55$, n.s.). Después del entrenamiento, los niveles de corticosterona plasmática se incrementaron con respecto a los niveles basales tanto inmediatamente después, como a los 30 minutos ($p < 0,001$ para ambos). Sin embargo, transcurridos 90 minutos desde el entrenamiento la corticosterona ya parece haber recuperado los niveles basales. El *test de Dunnet* realizado *a posteriori* nos confirma el hecho de que en el minuto 0 los tres grupos de ansiedad difieren con respecto a sus niveles de corticosterona basales ($p < 0,001$ para todos los grupos) y que a los 30 minutos del entrenamiento todos los grupos continúan sin haber vuelto a sus niveles basales. Sin embargo, los animales LA han sido los más eficaces en la retroalimentación del eje ya que son los únicos en los que sus niveles de corticosterona a los 30 minutos han descendido lo suficiente como para diferir de los obtenidos tras el entrenamiento ($p = 0,019$).

Resultados

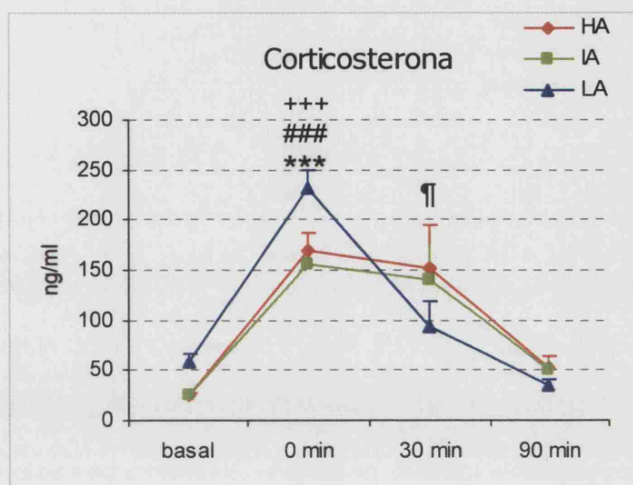


Figura 22. Niveles de corticosterona basales y después del entrenamiento en el CMT. Basal: HA(17), IA (16), LA (19); 0 min: HA(10), A (10), LA (9); 30 min: HA(8), IA (9), LA (8); 90 min: HA(7), IA (8), LA (10).
+++p<0.001 HA vs basal
p<0.001 IA vs basal,
***p<0.001 LA vs basal.
¶ p<0.05 LA 30 min vs KA basal.

Para revisar los resultados estadísticos de la corticosterona basal, mirar el apartado 1.1.1.

Valoración de los niveles de glucosa en sangre tras el entrenamiento en el CMT

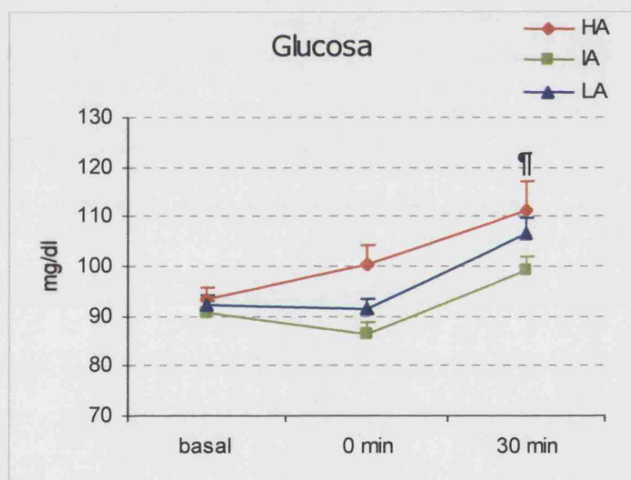


Figura 23. Niveles de glucosa basales y después del entrenamiento del CMT. Basal: HA(10), IA (10), LA (10); 0 min: HA(9), A (9), LA (10); 30 min: HA(9), IA (9), LA (10).
¶ p<0.05 LA 30min vs LA basal.

El ANOVA de dos vías confirmó un incremento de los niveles de glucosa a lo largo del tiempo ($F_{2,77}=19,96$, $p<0,001$) así como un efecto de la ansiedad ($F_{2,77}=8,1$, $p=0,001$), apuntando a que los animales más ansiosos muestran un incremento mayor en los niveles plasmáticos de glucosa tras el condicionamiento al tono en comparación con los animales de ansiedad intermedia ($p=0,001$). La interacción 'Ansiedad' x 'Tiempo' no fue significativa ($F_{4,77}=1,23$, n.s.). El test de Dunnet realizado a continuación únicamente nos reveló que dentro del grupo LA los valores obtenidos a los 30 minutos del entrenamiento difirieron significativamente de los niveles basales de dichos animales ($p=0,030$).

Evaluación de la dosis de buspirona a utilizar

Es interesante observar cómo, dentro del grupo de animales intactos, cada subgrupo siguió comportándose según lo predecible en función de su rasgo de ansiedad. La Figura 24.a. muestra el tiempo que las ratas estuvieron en el compartimento iluminado, y por tanto ansiogénico. El ANOVA de dos vías reveló un efecto tanto de la ansiedad ($F_{2,59}=9,68$, $p<0,001$) como de la interacción entre los factores ('Ansiedad' x 'Tratamiento': $F_{4,59}=2,79$, $p=0,034$), pero no del tratamiento ($F_{2,59}=0,72$, n.s.). Tal y como indicó el análisis *a posteriori*, los animales intactos que habían sido clasificados como LA en el LCE pasaron más tiempo en el compartimento iluminado que los HA ($p=0,019$). Si analizamos sólo en el grupo HA, el ANOVA nos mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{2,20}=3,76$, $p=0,041$) y el *test de Tukey* reveló una tendencia cercana a la significación a que las ratas HA tratadas con buspirona permanezcan más tiempo explorando en la zona iluminada de la caja que las ratas intactas ($p=0,055$). Con respecto a la latencia a salir a la luz (ver Figura 24.b.) se constató que las ratas intactas LA eran menos ansiosas que las HA ($p=0,009$) tardando menos tiempo en salir de la zona oscura y explorar el otro lado de la caja. Así, el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del factor 'ansiedad' ($F_{2,59}=8,29$, $p=0,001$), pero no del tratamiento ($F_{2,59}=0,85$, n.s.) ni de la combinación de factores ($F_{4,59}=1,52$, n.s.). Al analizar el número de veces que los animales pasaron de la zona oscura a la iluminada encontramos tanto un efecto del factor 'Ansiedad' ($F_{2,59}=9,51$, $p<0,001$), como de la interacción 'Ansiedad' x 'Tratamiento' ($F_{4,59}=3,34$, $p=0,016$). El tratamiento por sí mismo no afectó a este parámetro ($F_{2,59}=0,82$, n.s.). Así, los sujetos LA intactos entraron significativamente más veces a la zona iluminada que los HA ($p=0,005$).

Caja luz-oscuridad

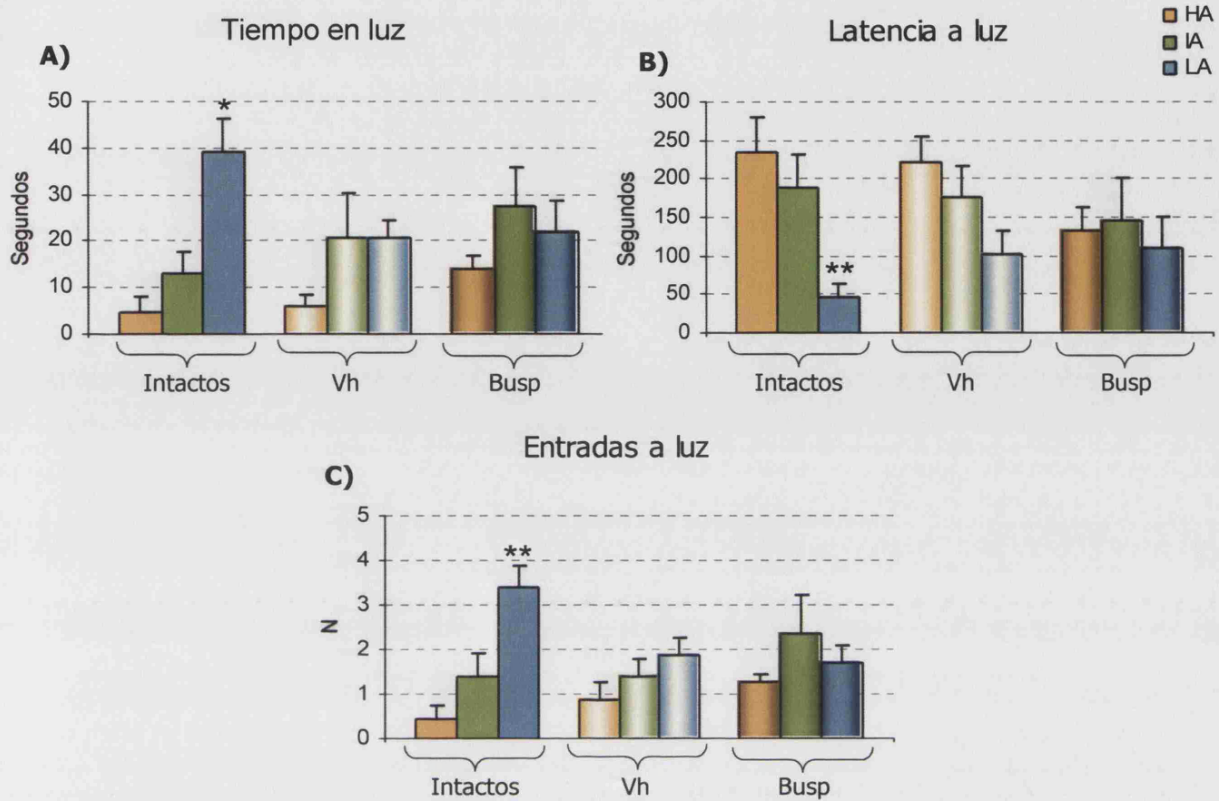


Figura 24. Evaluación del efecto de la dosis de buspirona en la CLO. A) Tiempo en el compartimento con luz, B) Latencia a salir al compartimento con luz, C) Número de entradas al compartimento con luz para cada tratamiento: intactos (HA(7), IA (8), LA (8)), vehículo (Vh) (HA(8), IA (8), LA (8)) y buspirona (Busp) (HA(8), IA (8), LA (7)).
**p<0.01 LA vs HA

Efecto del tratamiento con buspirona antes del entrenamiento del CMT

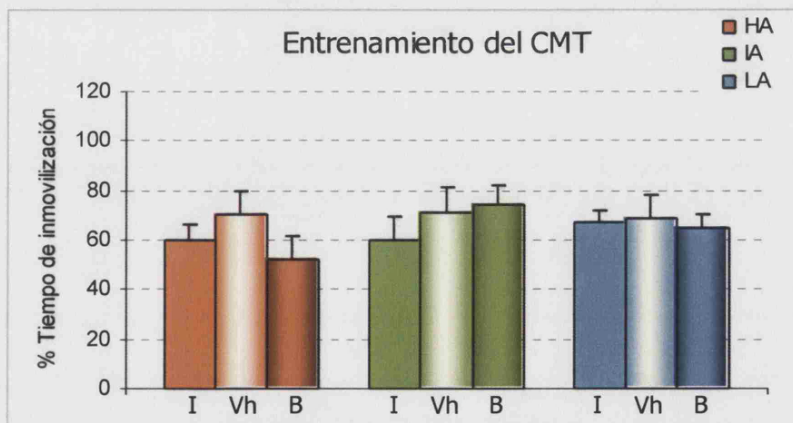


Figura 25. Porcentaje de tiempo de inmovilización durante el entrenamiento del CMT para los tres grupos de tratamiento y de ansiedad: animales intactos (I): HA (11) IA (8), LA (11); Vehículo (Vh): HA (14), INT (12), LA (10) y buspirona (B): HA (7), IA (9), LA (7).

Resultados

Se inyectó el fármaco o el vehículo 1 hora de introducir a los animales en las cajas de condicionamiento para el entrenamiento. Como puede observarse en la Figura 26, el porcentaje de inmovilización de los animales tras las descargas en el entrenamiento no se vio afectado ni por el tratamiento ($F_{2,80}=2,47$, n.s.) ni por el rasgo de ansiedad ($F_{2,80}=2,09$, n.s.).

Al cabo de 48 horas se realizó la prueba de memoria:

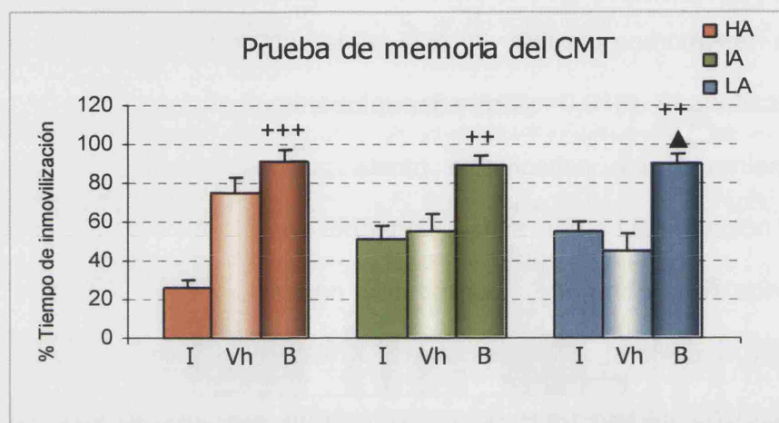


Figura 26. Evaluación del efecto de la bupiriona en el porcentaje de tiempo de inmovilización en el CMT para los tres grupos de tratamiento y de ansiedad: animales intactos (I): HA (9) IA (12), LA (13); Vehículo (Vh): HA (12), INT (14), LA (12) y bupiriona (B): HA (6), IA (8), LA (8). ++ $p<0.01$ Bupiriona vs intactos, +++ $p<0.001$ bupiriona vs intactos, ▲ $p<0.05$ bupiriona vs Vh.

El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del tratamiento en la evaluación de memoria ($F_{2,94}=27,31$, $p<0,001$) así como una interacción 'Tratamiento' x 'Ansiedad' ($F_{4,94}=5,12$, $p=0,001$). No se encontró efecto de la ansiedad ($F_{2,94}=0,78$, n.s.). El análisis post hoc reveló que el tratamiento con bupiriona antes del entrenamiento indujo un incremento en el tiempo de inmovilización de los animales con respecto a los sujetos intactos, afectando a los tres grupos de ansiedad: HA ($p<0,001$), IA ($p=0,005$) y LA ($p=0,004$), así como un efecto favorecedor del fármaco ansiolítico en el condicionamiento con respecto al tratamiento con Vh en los LA ($p=0,01$). Sin embargo, en los IA sólo hay una tendencia cercana a la significación ($p=0,059$), mientras que no hay diferencias entre los HA-Vh y los HA-B. Al analizar lo que ocurre con el grupo de animales intactos, vemos que el hecho de que los animales más ansiosos condicionen menos se mantiene, siendo esta diferencia significativa con respecto a los dos otros dos grupos de ansiedad (HA vs IA:

Resultados

$p=0,007$; HA vs LA: $p=0,002$). Estos resultados apuntan a un posible efecto del pinchazo en el aprendizaje del CMT en los animales con elevados niveles de ansiedad intrínseca.

Reevaluación de la memoria emocional asociada al CMT una semana después

En este caso, el análisis estadístico sólo mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{2,89}=5,49$, $p=0,006$), y una tendencia a la significación en el caso del factor 'Ansiedad' ($F_{2,89}=3,09$, $p=0,051$) y de la interacción de factores ($F_{4,89}=2,34$, $p=0,062$). El análisis *a posteriori* sólo reveló que las ratas LA tratadas con buspirona permanecían más tiempo inmóviles que las LA intactas ($p=0,049$).

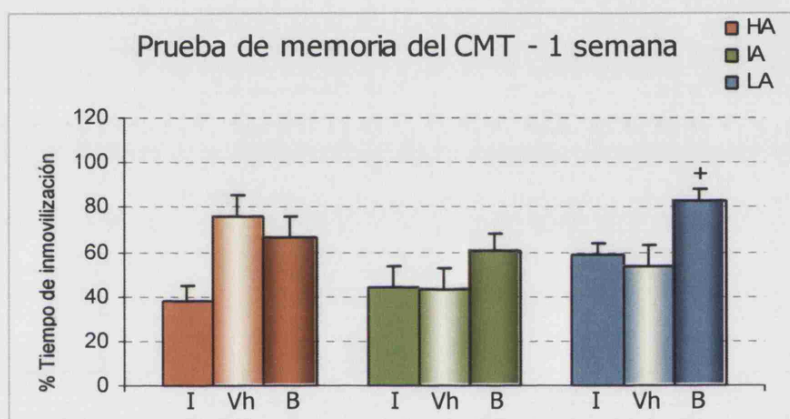


Figura 27. Evaluación del efecto de la dosis de buspirona en el porcentaje de tiempo de inmovilización en el CMT a la semana, para los tres grupos de tratamiento y de ansiedad: animales intactos (I): HA (10) IA (11), LA (13); Vehículo (Vh): HA (10), INT (13), LA (11) y buspirona (B): HA (6), IA (7), LA (7). + $p<0,05$ Buspirona vs intactos.

Efecto de la inyección con vehículo en el estado de ansiedad de los animales

La inyección de vehículo provocó una bajada general en los niveles de corticosterona cuando se midieron 1 hora después de la administración ($F_{1,97}=13,90$, $p<0,001$). También hay un efecto de la ansiedad ($F_{2,97}=20,39$, $p<0,001$) y de la interacción entre ambos factores ('Ansiedad' x 'Tratamiento': $F_{2,97}=4,19$, $p=0,018$). El *post hoc* mostró que en el grupo LA existía una tendencia cercana a la significación a que tras sus niveles de corticosterona estuvieran disminuidos tras el pinchazo con respecto a los basales ($p=0,069$). Cuando analizamos por separado los valores post – inyección de Vh ($F_{2,50}=5,90$, $p=0,005$), el *test de Dunnett* apuntó a que las ratas menos ansiosas o LA liberaran más corticosterona que las más ansiosas o HA, quedando esta diferencia muy próxima a la significación ($p=0,052$).

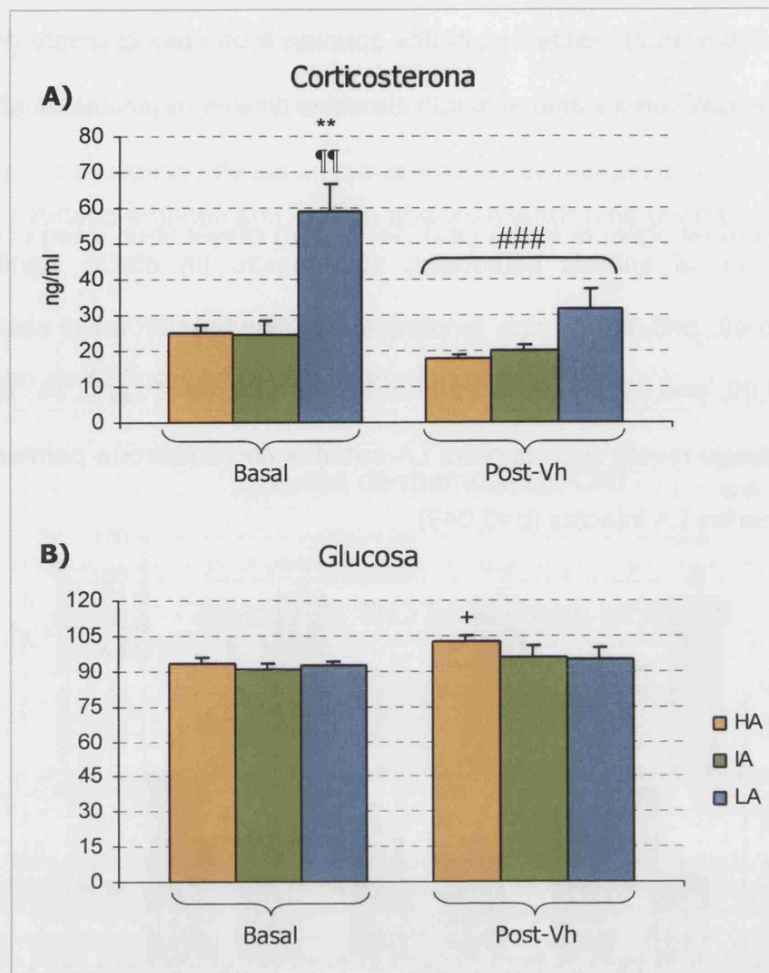


Figura 28. Evaluación del efecto del pinchazo de Vh en la corticosterona (A): HA (17), IA (18), LA (16) y en la glucosa (B): HA (10), IA (11), LA (10). ** $p < 0.01$ LA vs HA, $***p < 0.001$ LA vs IA, + $p < 0.05$ HA post-Vh vs HA basal, $###p < 0.001$ post-Vh vs basal.

Con respecto a la glucosa, el ANOVA reveló un efecto del factor 'Ansiedad' ($F_{2,55}=3.47$, $p=0.038$) y de la inyección ($F_{2,55}=10.74$, $p=0.002$). El análisis posterior mostró una diferencia significativa entre los niveles de glucosa antes y después de la inyección para el grupo HA ($p=0.034$), y una tendencia a la significación entre los animales LA y HA post – inyección de Vh ($p=0.094$). No se encontró efecto de la interacción de factores ('Ansiedad' x 'Inyección' $F_{2,55}=1.31$, n.s.).

Ver el apartado 1.1. para comprobar los análisis individuales de los valores basales.

➤ Inhibición latente

Efecto del rasgo de ansiedad en la IL: modulación farmacológica

La estadística reveló un efecto significativo para los siguientes parámetros: 'Tratamiento' ($F_{2,96}=4.26$, $p=0.017$), 'Pre-exposición' ($F_{2,96}=14.93$, $p<0.001$) y una tendencia

en la interacción entre ambos factores ($F_{2,96}=2.95$, $p=0.057$). Sin embargo el análisis *a posteriori* no evidenció ninguna diferencia entre los grupos.

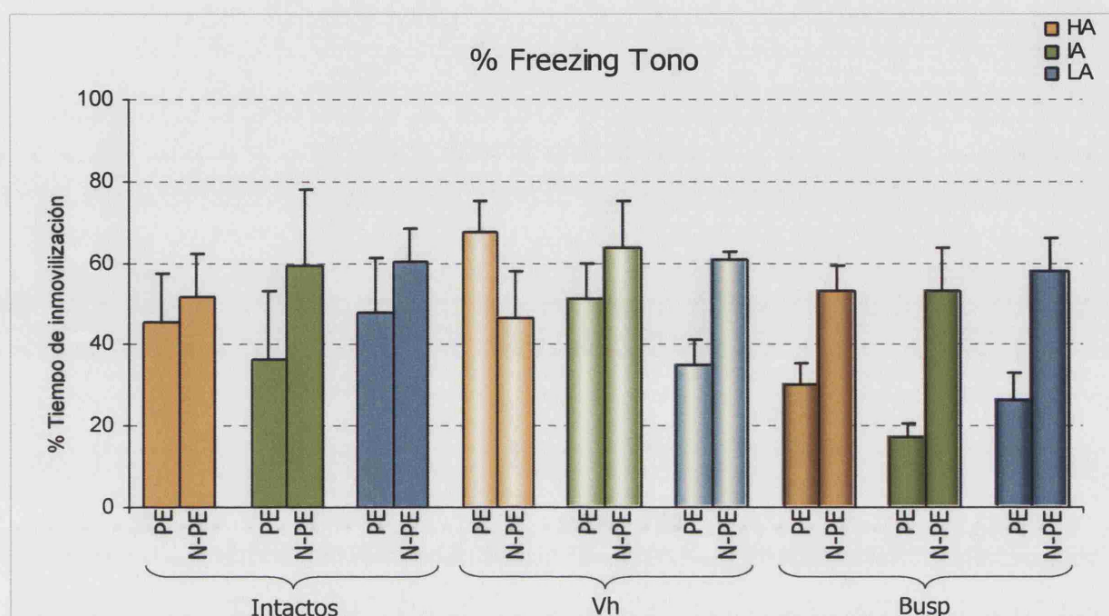


Figura 29. Evaluación del efecto de la bupiriona en el porcentaje de tiempo de inmovilización en el CMT para los tres grupos de tratamiento y de ansiedad, tanto pre-expuestos (PE) como no preexpuestos (N-PE): animales intactos (I): HA PE (5), N-PE (5); IA PE (6), N-PE (5); LA PE (8) N-PE (8); Vehículo (Vh): HA PE (6), N-PE (6) INT PE (6), N-PE (6); LA PE (8), N-PE (5) y bupiriona (Busp): HA PE (8), N-PE (7); IA PE (6), N-PE (6); LA PE (7), N-PE (6).

Si dividimos la población únicamente en dos grupos de ansiedad, obtenemos diferencias significativas para el tratamiento ($F_{2,101}=4.81$, $p=0.010$), el factor "Pre-exposición" ($F_{2,101}=17.94$, $p<0.001$), la interacción "Ansiedad x Pre-Exposición" ($F_{2,101}=8.94$, $p=0.003$) así como 'Tratamiento' x 'Pre-Exposición' ($F_{2,101}=3.79$, $p=0.026$). No tuvieron efecto significativo sobre el tiempo de inmovilización los siguientes factores: 'Ansiedad' ($F_{1,101}=1.28$, n.s.) ni 'Ansiedad' x 'Tratamiento' x 'Pre-exposición' ($F_{2,101}=0.57$, n.s.). El *test de Dunnett* realizado posteriormente indicó que los animales menos ansiosos tratados con bupiriona y pre-expuestos al tono condicionaron significativamente menos que los que no habían sido pre-expuestos ($p=0.016$). Al realizar un ANOVA de dos vías con el fin de evaluar el efecto de la prueba de la inhibición latente dentro de cada tratamiento se observó que, dentro de los grupo tratado con vehículo hay un efecto significativo tanto la ansiedad ($F_{1,34}=6.76$, $p=0.014$) como de su interacción con la pre-exposición al tono ($F_{1,34}=4.72$, $p=0.037$). Cuando analizamos el efecto de la bupiriona, el ANOVA mostró un efecto del factor 'Pre-exposición' ($F_{1,35}=40.87$, $p<0.001$). En este caso los animales pre-

expuestos al tono permanecieron menos tiempo inmóviles durante la prueba de memoria que los que no lo habían escuchado antes, tanto en el caso de las ratas HA ($p=0,007$) como de las LA ($p<0,001$).

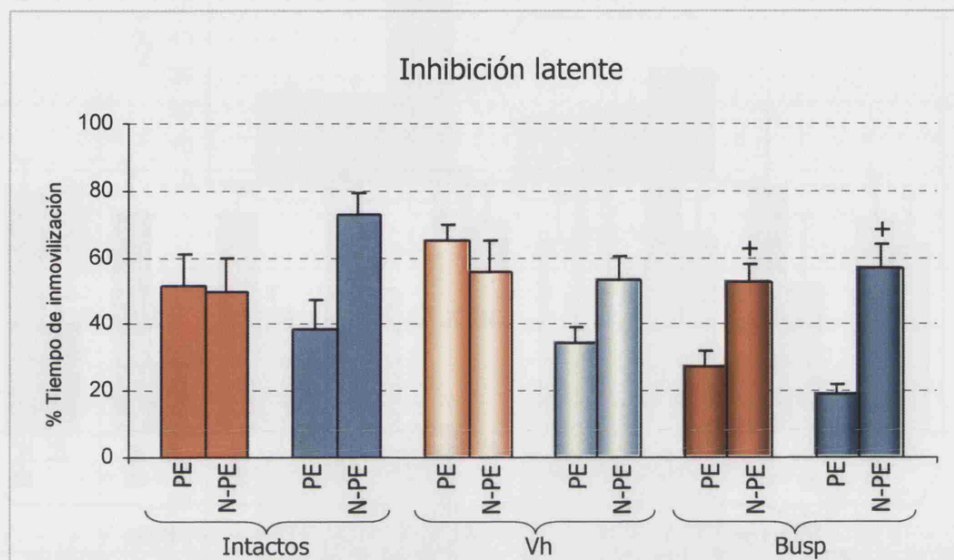


Figura 30. Evaluación del efecto de la bupiriona en el porcentaje de tiempo de inmovilización en el CMT para los tres grupos de tratamiento tanto pre-expuestos (PE) como no preexpuestos (N-PE), dividiendo a toda la población en HA y LA: animales intactos (I): HA PE (8), N-PE (8); LA PE (11) N-PE (9); Vehículo (Vh): HA PE (10), N-PE (9); LA PE (10), N-PE (9) y bupiriona (Busp): HA PE (11), N-PE (10); LA PE (9), N-PE (9). + $p<0.05$ PE vs N-PE

➤ Efecto de la adrenalectomía con reemplazamiento de bajos niveles de corticosterona en el rasgo de ansiedad

Efecto de la adrenalectomía en la ansiedad

El *test de Kruskal-Wallis* nos indicó que existe una diferencia significativa en el tiempo que permanecieron los animales en la parte iluminada de la caja ($p=0,001$). El *test de Mann-Whitney* realizado *a posteriori* mostró diferencias significativas entre los animales LA y HA *sham* ($p=0,003$), así como entre los LA y los IA *sham* ($p=0,011$), pasando siempre más tiempo en el compartimento con luz los animales menos ansiosos; también aparece una tendencia a la significación entre las ratas LA *sham* y las ADX ($p=0,065$), tendiendo a estar menos tiempo en luz los sujetos adrenalectomizados.

También se observó que los animales LA *sham* tardaron menos tiempo en salir a la luz que los HA *sham* ($p=0,003$) y apareció una tendencia a la significación entre los LA *sham* y los IA *sham* ($p=0,058$) en el mismo sentido. Con respecto al número de veces que los animales cruzaron desde el lado oscuro de la caja al compartimento iluminado, de

Resultados

nuevo los animales *sham* menos ansiosos o LA entraron significativamente más veces en la zona iluminada que los más ansiosos o HA ($p=0,004$), y que los de ansiedad intermedia ($p=0,016$). Para este parámetro, también hay diferencias significativas entre los LA *sham* y los LA ADX ($p=0,042$).

Efecto de la adrenalectomía en el CMT

No hubo diferencias entre grupos en el tiempo de inmovilización en el entrenamiento para el factor 'Ansiedad' ($F_{1,29}=0,05$, n.s.), ADX ($F_{1,29}=0,06$, n.s.) ni la interacción ($F_{1,29}=0,19$, n.s.). Con respecto a la prueba de memoria, el ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la ansiedad ($F_{1,29}=7,85$, $p=0,002$), pero el *post hoc* no confirmó diferencias entre ninguno de los grupos analizados.

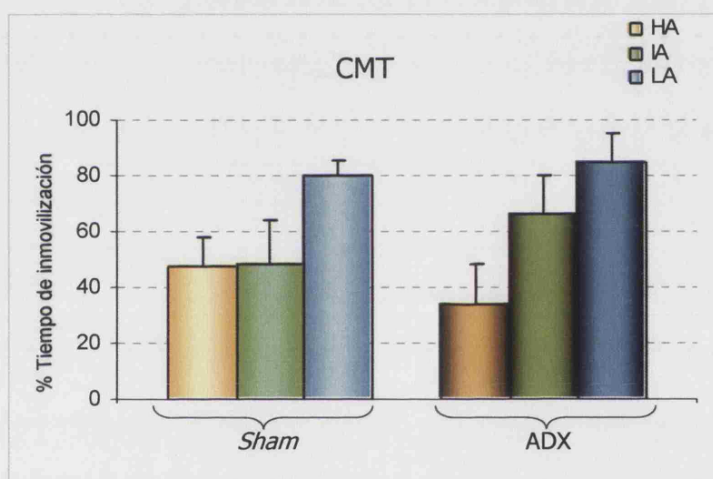


Figura 31. % tiempo de inmovilización durante la prueba de memoria del CMT para *sham*: HA(7), IA (6), LA (7) y ADX: HA (6), IA (4), LA (5).

Reevaluación de la memoria emocional asociada al CMT una semana después en las ratas operadas

Cuando analizamos el porcentaje de tiempo de inmovilización de las ratas en la prueba de memoria realizada una semana después del entrenamiento, encontramos un efecto de la interacción 'Ansiedad' x 'Adrenalectomía' ($F_{1,28}=4,05$, $p=0,029$). Las ratas LA *sham* mostraron un mayor índice de memoria en relación con las HA *sham* ($p=0,006$) y las IA *sham* ($p=0,045$), que permanecieron inmóviles menos tiempo durante la prueba. Además, las ratas LA adrenalectomizadas y con bajos niveles de corticosterona son las únicas que difirieron en el resultado en comparación con las ratas LA del grupo *sham* ($p=0,031$). No se encontró efecto de la adrenalectomía ($F_{1,28}=2,75$, n.s.) ni de la ansiedad

($F_{1,28}=2,71$, n.s.).

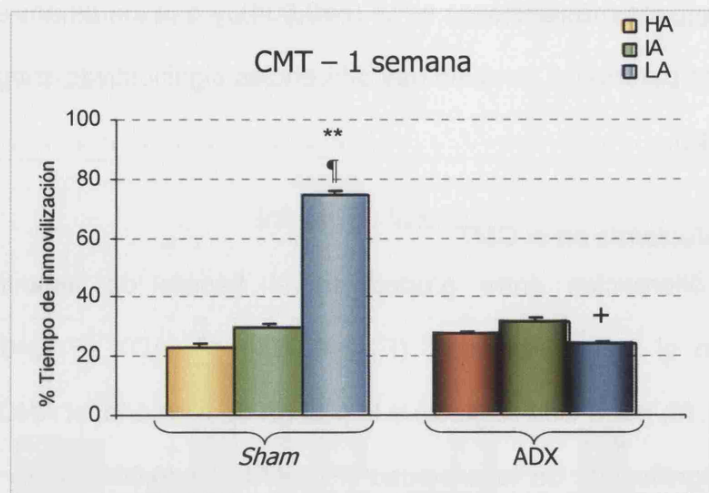


Figura 32. Porcentaje de tiempo de inmovilización durante la prueba de memoria del CMT para sham: HA(7), IA (5), LA (8) y ADX: HA (5), IA (5), LA (4). ** $p<0.01$ LA vs HA, $\dagger p<0.05$ LA vs IA, + $p<0.05$ ADX vs sham.

Valoración de los niveles de corticosterona plasmática tras la prueba de memoria a la semana de las ratas operadas

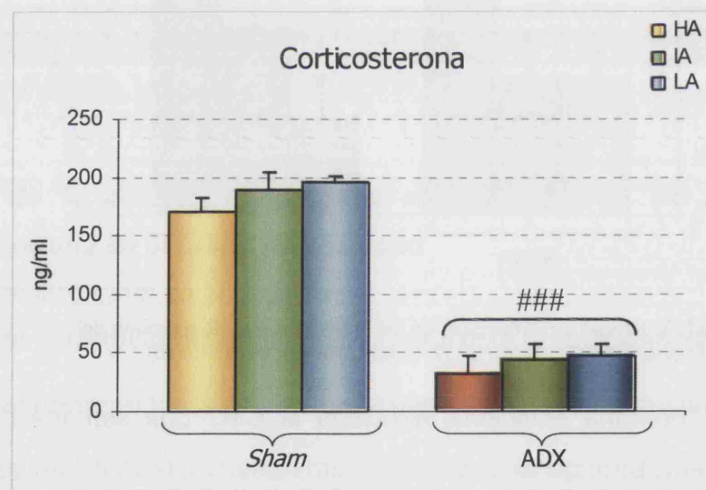


Figura 33. Niveles de corticosterona tras la prueba de memoria realizada 1 semana después del CMT en ratas sham: HA(7), IA (5), LA (8) y ADX: HA (5), IA (5), LA (4). ### $p<0.001$ ADX vs sham

Como puede observarse en la Figura 33, las ratas adrenalectomizadas con pellet de corticosterona mostraron niveles de corticosterona muy inferiores a los de las ratas sham tras la exposición al tono ($F_{1,28}=92,78$, $p<0,001$), lo que demuestra que la extracción de las glándulas suprarrenales fue completa impidiéndose la liberación de corticosterona en el grupo ADX tras la exposición a los sujetos a una situación estresante como es el tono.

El ANOVA no reveló efecto del factor 'Ansiedad' ($F_{2,28}=0.64$, n.s.) ni de la

interacción 'Ansiedad' x 'Adrenalectomía' ($F_{2,28}=0,05$, n.s.).

1.2. Efecto del rasgo de ansiedad en la vulnerabilidad al estrés y al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento

1.2.1. Efecto del ECI en la ganancia de peso de los animales

En la Tabla 3 se muestran los valores de la media de la ganancia de peso dentro de cada grupo a lo largo de las semanas con respecto al peso inicial, así como las probabilidades de los estadísticos. Como puede observarse en el grupo 'Jóvenes', en la segunda semana de estrés los animales estresados y controles difieren significativamente en la ganancia de peso, diferencia que se mantiene hasta el momento del sacrificio. En el caso del experimento de animales que se dejaron envejecer, dicha diferencia en la tercera semana, recuperando el grupo 'Estrés' la media de ganancia de peso 3 semanas después de haber concluido el protocolo de estrés.

Ganancia de peso

JOVENES

	1	2	3	4	5
Estrés	1.07 ± 0.005	1.10 ± 0.005	1.15 ± 0.006	1.19 ± 0.006	1.22 ± 0.008
Control	1.07 ± 0.003	1.12 ± 0.005	1.18 ± 0.006	1.22 ± 0.007	1.27 ± 0.008
Probabilidad	n.s.	0.034	0.0004	0.0002	0.0003

VIEJOS

	1	2	3	4	5	6	7	8
Estrés	1.08 ± 0.005	1.11 ± 0.009	1.12 ± 0.01	1.10 ± 0.01	1.12 ± 0.02	1.17 ± 0.02	1.21 ± 0.02	1.25 ± 0.02
Control	1.08 ± 0.003	1.11 ± 0.006	1.14 ± 0.005	1.21 ± 0.009	1.22 ± 0.007	1.21 ± 0.01	1.25 ± 0.01	1.27 ± 0.11
Probabilidad	n.s.	n.s.	0.035	0.0001	0.0002	0.046	n.s.	n.s.

Tabla 4. Ganancia de peso para los grupos Estrés y Control. Se representa la media ± E.M.E así como las probabilidades estadísticas. Los valores dentro del protocolo de estrés son los que van de la medida 2 a la 5. Jóvenes: Estrés (30), control (33). Viejos: Estrés (30), control (31).

1.2.2. Evaluación conductual y cognitiva

➤ **Laberinto acuático de Morris:** 4 meses de edad

Los animales tanto estresados como controles fueron entrenados en el LAM durante dos días, y su memoria espacial fue evaluada 24 horas después del último entrenamiento.

Entrenamiento: 3 ensayos de 120 segundos durante 2 días.

El ANOVA de medidas repetidas de las distancias mostró diferencias significativas en el aprendizaje espacial entre los diferentes grupos ($F_{1,54}=4,47$, $p=0,016$), pero no hay diferencias causadas por el estrés ($F_{1,54}=1,67$, n.s.) ni efecto de la interacción entre factores ($F_{1,54}=0,99$, n.s.).

Aprendizaje espacial

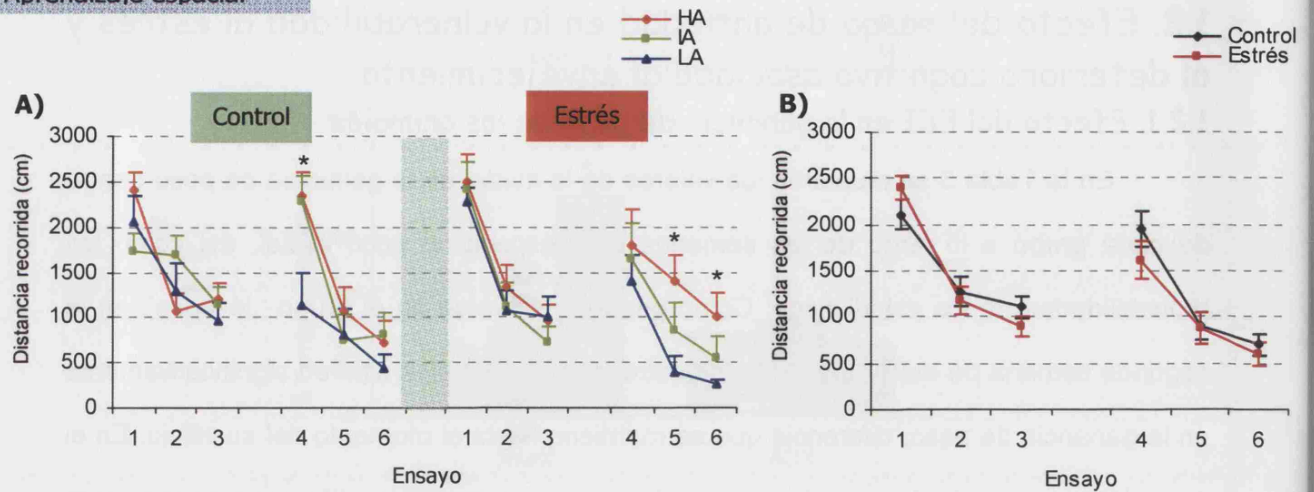


Figura 34. Distancia recorrida a la plataforma escondida durante el aprendizaje espacial en el LAM. Control: HA(11), IA (10), LA (9); Estrés: HA(10), IA (10), LA (10)
* $p < 0.05$ vs LA.

Cuando se analizó por separado el grupo 'Estrés', no se observó un efecto de la ansiedad en el ANOVA de medidas repetidas a lo largo de los dos días de entrenamiento ($F_{2,27}=2,87$, $p=0,070$), pero si al analizar el segundo día por separado ($F_{2,27}=3,63$, $p=0,040$). Como puede observarse en la Figura 34.a., las ratas LA recorrieron una distancia menor para alcanzar la plataforma que las HA tanto en el quinto ($p=0,025$) como en el último ensayo ($p=0,046$). Para ver la estadística de los animales control mirar el experimento 5.

Al analizar el tiempo que los animales nadaron en el área más próxima a la pared de la piscina, encontramos que en el cuarto ensayo hay un efecto global de la ansiedad ($F_{2,54}=3,28$, $p=0,045$) que indica que las ratas más ansiosas, las HA, nadaron más tiempo por la zona externa de la piscina que las LA ($p=0,033$). No hubo efecto ni del estrés ($F_{1,54}=0,41$, n.s.) ni de la interacción 'Ansiedad' x 'Estrés' ($F_{1,54}=3,28$, $p=0,045$).

Al analizar el tiempo que los animales nadaron en el área más próxima a la pared de la piscina, encontramos que en el cuarto ensayo hay un efecto global de la ansiedad ($F_{2,54}=3,28$, $p=0,045$) que indica que las ratas más ansiosas, las HA, nadaron más tiempo por la zona externa de la piscina que las LA ($p=0,033$). No hubo efecto ni del estrés ($F_{1,54}=0,41$, n.s.) ni de la interacción 'Ansiedad' x 'Estrés' ($F_{1,54}=3,28$, $p=0,045$).

- Prueba de memoria: un ensayo de 90 segundos

No se encontraron diferencias en ninguno de los parámetros medidos, ni en los 90 segundos totales que duró la prueba ni en los 30 primeros segundos de la misma.

Prueba de memoria – 30 segundos

CONTROL

Parámetro	Grupo		
	HA	IA	LA
% Tiempo en el exterior de la piscina	51,85 ± 9,76	45,75 ± 8,73	43,20 ± 11,52
% Tiempo en Q1	23,56 ± 3,19	23,13 ± 3,95	29,04 ± 5,74
% AP	4,17 ± 1,11	3,88 ± 0,93	4,93 ± 1,45
Q1/Q1+Q3	0,87 ± 0,15	1,02 ± 0,36	1,48 ± 0,47

ESTRÉS

Parámetro	Grupo		
	HA	IA	LA
% Tiempo en el exterior de la piscina	36,48 ± 8,04	39,2 ± 9,88	41,69 ± 7,17
% Tiempo en Q1	30,32 ± 3,01	26,31 ± 5,2	34,56 ± 4,2
% AP	8,72 ± 1,65	5,69 ± 2,44	12,64 ± 2,8
Q1/Q1+Q3	0,54 ± 0,06	0,47 ± 0,08	0,55 ± 0,06

Tabla 5. Resultados de la prueba de memoria en el LAM durante los primeros 30 segundos de prueba. Los valores representan la media ± el E.M.E. Control: HA (11), IA (10), LA (9); Estrés: HA (10), IA (10), LA (10). Q1 es el cuadrante diana y Q3 el cuadrante opuesto a éste. AP es el área de 20 cm alrededor de la plataforma.

➤ **Reevaluación de los niveles de ansiedad: 5 meses de edad**

Reevaluamos los niveles de ansiedad de los animales mediante dos pruebas: la CLO y el CA.

Reevaluación de los niveles de ansiedad con la CLO

El análisis del tiempo que los animales permanecieron en el compartimento iluminado reveló un efecto tanto del estrés ($F_{1,50}=5,37$, $p=0,025$) como de la ansiedad ($F_{2,50}=4,61$, $p=0,015$), indicando, tal y como se muestra en la Figura 35, que los animales controles pasaron más tiempo en la zona oscura de la caja que los que habían sido sometidos a ECI, así como los LA pasaron más tiempo que los HA ($p=0,009$). No se encontró efecto de la interacción entre el estrés y la ansiedad ($F_{2,50}=2,43$, n.s.). Con respecto a la latencia a salir a la zona iluminada, observamos que los animales estresados tardaron menos segundos en salir a la luz ($F_{1,50}=15$, $p<0,001$). El ANOVA de dos vías también reveló un efecto de la ansiedad ($F_{1,50}=5,5$, $p=0,007$), donde de nuevo, las LA mostraron un comportamiento menos ansioso que las HA ($p=0,006$). Tampoco hubo un efecto significativo de la interacción de factores para este parámetro ($F_{2,50}=0,82$, n.s.).

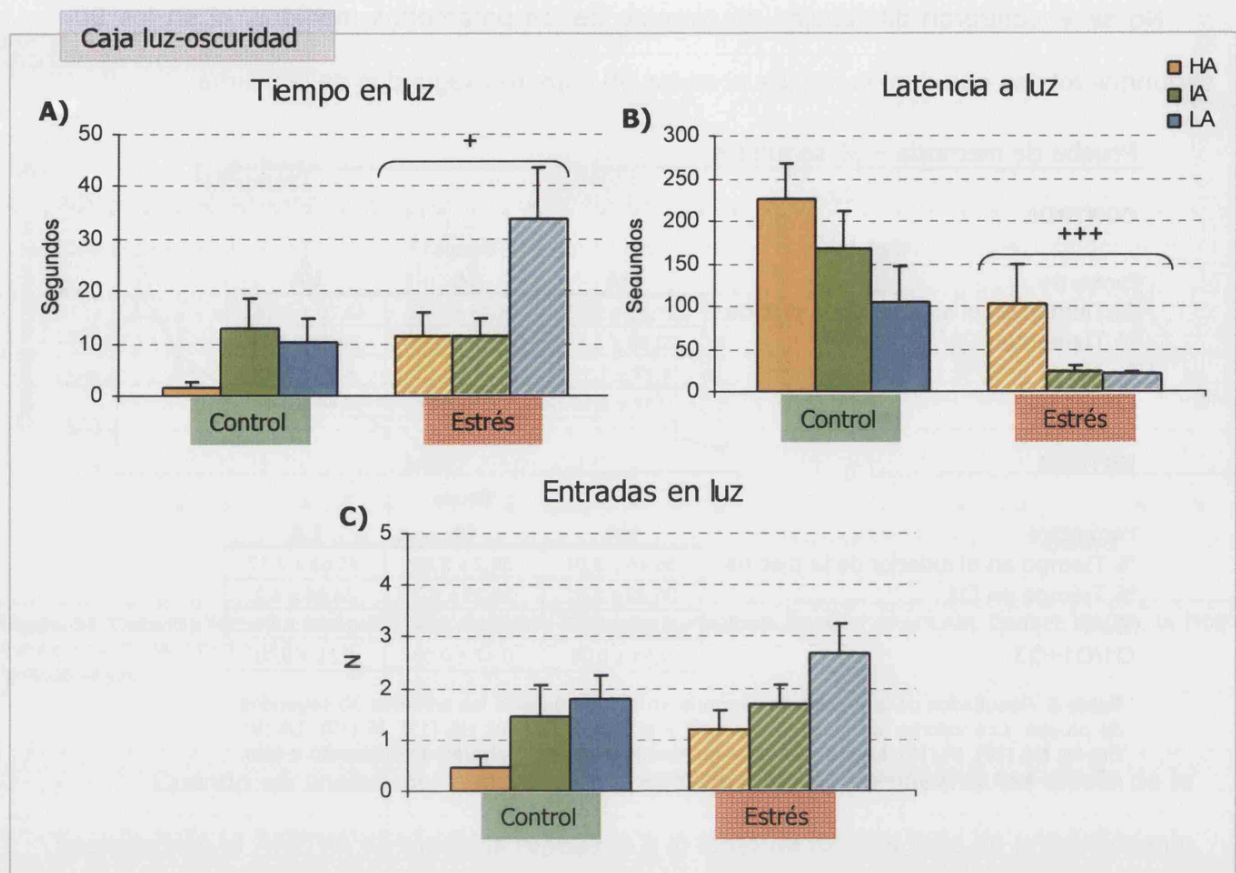


Figura 35. Reevaluación de la ansiedad en la CLO. **A)** Tiempo en el compartimento con luz, **B)** Latencia a salir al compartimento con luz, **C)** Número de entradas al compartimento con luz, para cada grupo: Control: HA(9), IA (11), LA (8); Estrés: HA(10), IA (9), LA (9) + $p<0.05$ Estrés vs Control, +++ $p<0.001$ Estrés vs Control.

En el análisis del número de entradas a luz únicamente encontramos un efecto global de la ansiedad ($F_{1,50}=5,52$, $p=0,007$), siendo las ratas evaluadas en el EPM como LA las que salieron más veces a la zona iluminada que las HA ($p=0,005$). El ANOVA no reveló efecto del estrés ($F_{1,50}=2,22$, n.s.) ni de la interacción 'Ansiedad' x 'Estrés' ($F_{2,50}=2,22$, n.s.) sobre el número de salidas a la luz.

También estudiamos las posibles correlaciones lineales entre los parámetros obtenidos en la CLO y el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (BA) en el LCE, que fue el índice a partir del cual clasificamos los animales al inicio de los experimentos.

Caia luz oscuridad

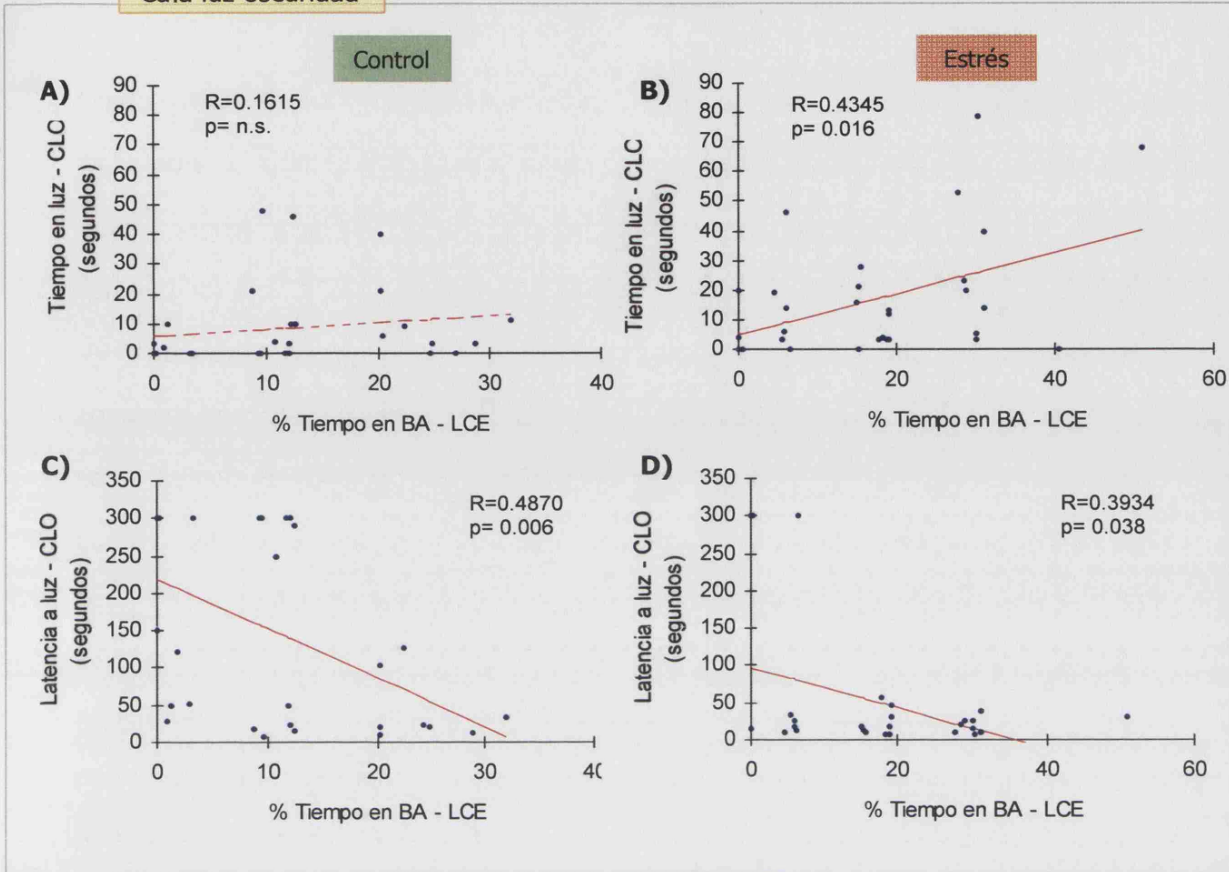


Figura 36. Correlación de los parámetros de la CLO con los del LCE: **A)** y **B)** Tiempo en el compartimento iluminado de la CLO - porcentaje de tiempo en los BA del LCE; **C)** y **D)** Latencia a salir a la luz en la CLO - porcentaje de tiempo en los BA del LCE para cada grupo: Control (30) y Estrés (28).

Reevaluación de los niveles de ansiedad en el CA

No se observaron diferencias significativas entre grupos para ningún parámetro del campo abierto para ninguno de los factores analizados.

La correlación con los resultados del LCE sólo fue significativa para el grupo 'Estrés'.

Campo abierto

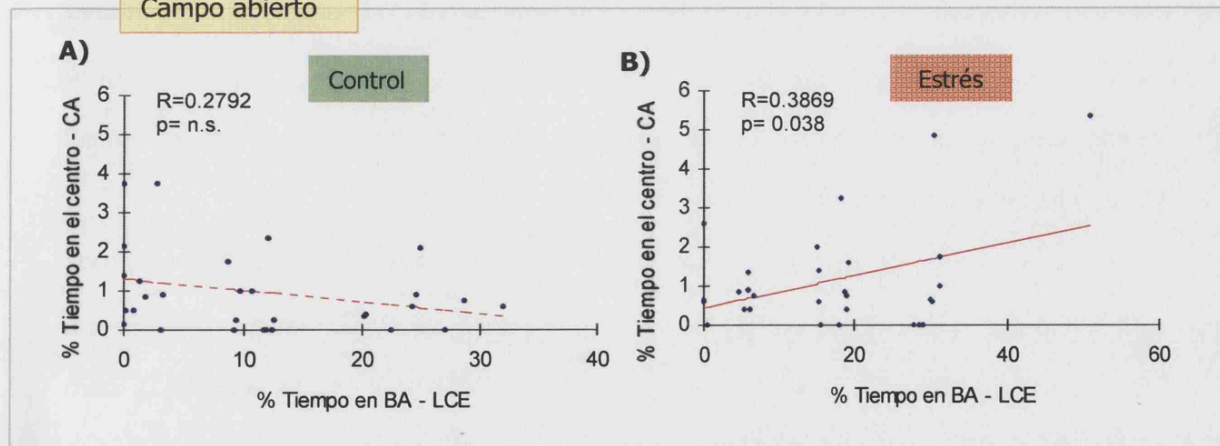


Figura 37. Correlación de los parámetros del CA con los del LCE: % Tiempo en el centro del CA - % Tiempo en BA del LCE. **A)** Control (31), **B)** Estrés (29).

➤ **Prueba de reconocimiento de objetos: 4 y 11 meses de edad**

- 4 meses de edad

El análisis de el ID obtenido en la PRO a los 4 meses de edad reveló un efecto tanto del estrés ($F_{1,51}=41,27$, $p<0,001$) como de la interacción 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,51}=4.88$, $p=0,012$), pero no así del rasgo de ansiedad ($F_{2,51}=1,01$, n.s.) Como muestra la Figura 38.a., los animales que fueron estresados obtuvieron un ID menor que los controles, difiriendo además HA y LA estrés de su grupo homólogo no estresado (HA: $p<0,001$, LA: $p=0,008$). Además, dentro del grupo "Estrés" los animales más ansiosos ejecutaron peor esta prueba de memoria que los animales IA ($p=0,049$). Si comparamos únicamente los extremos de población dentro del grupo de animales estresados, vemos que los LA realizan significativamente mejor esta prueba que los HA ($p=0,046$).

- 11 meses de edad

A los 11 meses de edad, únicamente se evidenció un efecto deletéreo del estrés en la realización de dicha prueba ($F_{1,51}=27,36$, $p<0,001$) y no del resto de parámetros ('Ansiedad': $F_{2,51}=2,54$, n.s.; 'Ansiedad' x Estrés': $F_{2,51}=0,91$, n.s.). El análisis con el *test de Tuckey* reveló que los animales HA estresados obtuvieron un ID significativamente menor que los HA no estresados ($p=0,002$), y una tendencia en el mismo sentido para los IA ($p=0,057$). Aunque durante la fase de entrenamiento a todos los animales se le permitió explorar los objetos durante el mismo tiempo, en la prueba de memoria los animales estresados exploraron menos los dos objetos que los animales controles en ambas ocasiones (4 meses: $F_{1,51}=6,86$, $p=0,012$; 11 meses: $F_{1,51}=8,31$, $p=0,008$), pero no hubo diferencias en cuanto al mismo parámetro en función de la ansiedad. De nuevo observamos que los animales HA parecen haber sido más vulnerables al efecto deletéreo del estrés sobre la memoria de reconocimiento de objetos cuando se compara con una *t de Student* con el grupo de animales menos ansioso ($p=0,048$).

Para estudiar el efecto del envejecimiento en la realización de la PRO, realizamos un ANOVA de medidas repetidas y obtuvimos un efecto tanto del estrés ($F_{1,51}=55,34$, $p<0,001$) como de la interacción entre el estrés y la ansiedad ($F_{2,51}=3,36$, $p=0,042$), pero no de la ansiedad por si misma ($F_{2,51}=2,5$, n.s.). Los animales más viejos tuvieron un índice de memoria inferior al de los jóvenes ($p<0,001$).

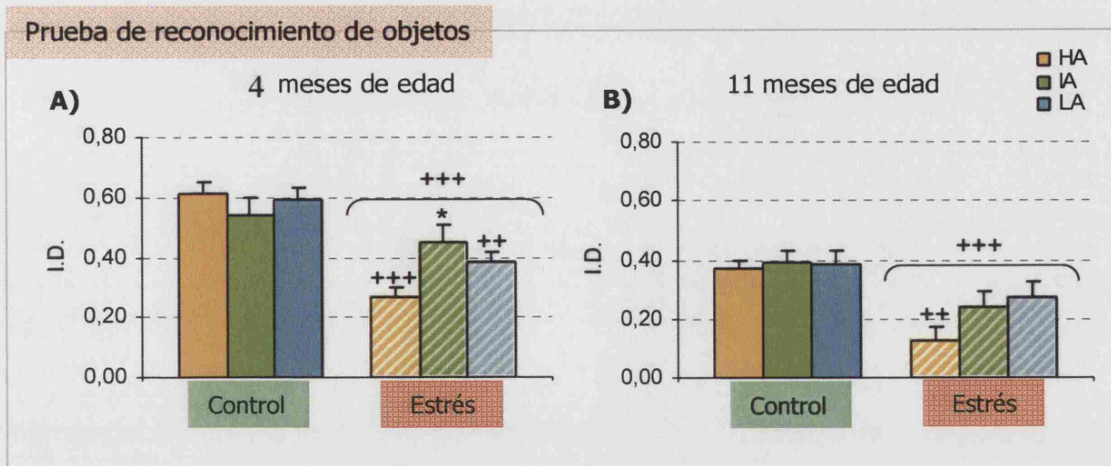


Figura 38. Índice de discriminación (ID) obtenido en la PRO. Control: HA (10), IA (11), LA (10); Estrés: HA (8), IA (9), LA (9).
* $p < 0.05$ IA vs HA; +++ $p < 0.001$ Estrés vs Control, ++ $p < 0.01$ Estrés vs Control

➤ **Prueba de reconocimiento alternancia espontánea: 20 meses de edad**

En esta prueba también se evalúa la memoria mediante un índice de discriminación o ID.

En este caso únicamente se puso de manifiesto un efecto deletéreo del estrés ($F_{2,43}=18,32$, $p < 0,001$).

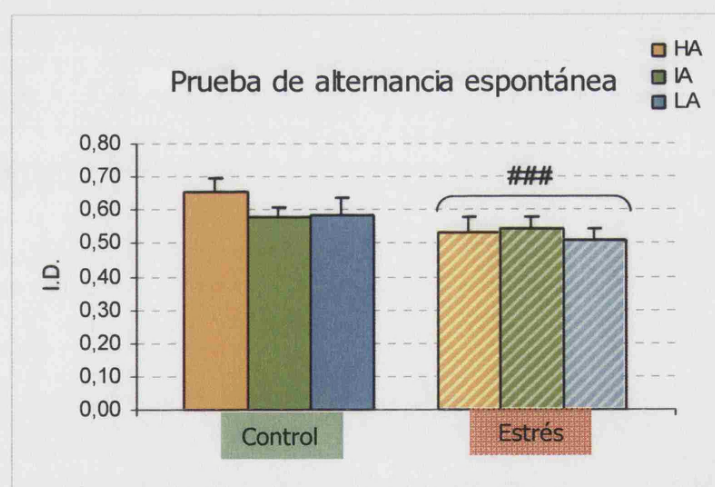


Figura 39. Índice de discriminación (ID) obtenido en la PAE. Control: HA (10), IA (10), LA (9); Estrés: HA (8), IA (8), LA (8).
* $p < 0.05$ IA vs HA; +++ $p < 0.001$ Estrés vs Control, ++ $p < 0.01$ Estrés vs Control

El ID no se vio afectado por el rasgo de ansiedad ($F_{2,47}=0,67$, n.s.) ni por la interacción entre la ansiedad y el estrés ($F_{2,47}=0,44$, n.s.).

➤ **Prueba de localización de objetos: 22 meses**

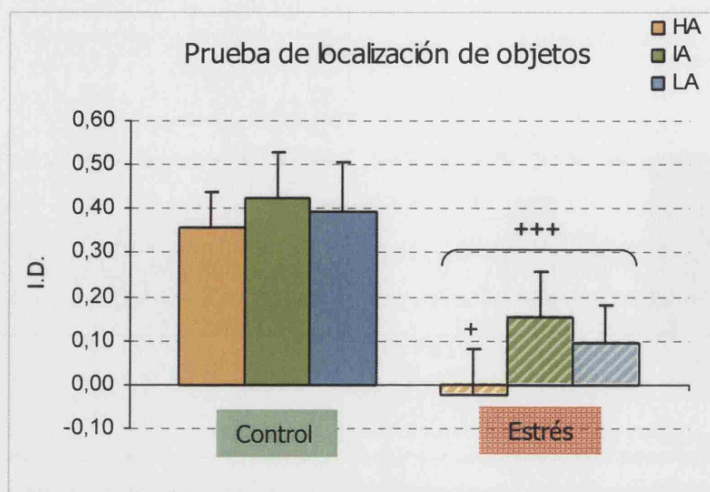


Figura 40. Índice de discriminación (ID) obtenido en la PLO. Control: HA (9), IA (9), LA (6); Estrés: HA (9), IA (8), LA (8). * $p < 0,05$ IA vs HA; +++ $p < 0,001$ Estrés vs Control, ++ $p < 0,01$ Estrés vs Control

Al analizar el índice de discriminación, el ANOVA de 2 vías mostró un efecto deletéreo del estrés ($F_{1,43}=18,32$, $p < 0,001$) sobre la memoria, pero no de la ansiedad ($F_{2,43}=0,66$, n.s.) ni de la interacción entre los factores ($F_{2,43}=0,01$, n.s.). El *post hoc* indicó que los animales HA estresados tuvieron un ID significativamente inferior a los HA controles ($p=0,047$). En este caso no hubo diferencias en el tiempo de exploración de los objetos.

1.2.3. Características bioquímicas

➤ **Niveles de corticosterona plasmática durante el estrés y tras el envejecimiento**

- 1er día de estrés

Los valores de corticosterona correspondientes al primer día de estrés son los utilizados para estudiar la respuesta del eje HPA de los tres grupos de ansiedad tras el condicionamiento de miedo al tono. Ver resultados en el apartado 1.1.2. de esta sección.

- 2ª semana de estrés

A los animales estresados se les sacó sangre en la segunda semana de estrés tras permanecer 1 hora sobre las plataformas elevadas, no encontrando diferencias significativas en los niveles de corticosterona plasmática ($F_{2,24}=3,40$, n.s.).

Resultados

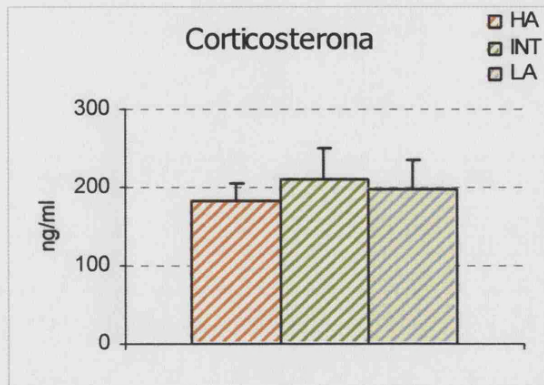


Figura 41. Niveles de corticosterona tras 1 hora en la plataforma elevada. HA(9), IA(9), LA(9)

- 3ª semana de estrés

En este caso se sacó sangre a tres tiempos: 0, 30 y 90 minutos, tanto a los estresados como a los controles. En el caso de los estresados, los dos primeros puntos coinciden con el inicio y el fin de una sesión de inmovilización en los cepos.

El ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del estrés al minuto 0 ($F_{1,52}=23,43$, $p<0,001$), al minuto 30 ($F_{1,42}=103,33$, $p<0,001$) y al minuto 90 ($F_{1,52}=18,62$, $p<0,001$). Además, en el minuto 30 se encontró además un efecto tanto de la ansiedad ($F_{2,42}=7,36$, $p=0,002$) como de la interacción 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,42}=6,57$, $p=0,003$). En el último punto de la curva, aparece un efecto de la ansiedad ($F_{2,43}=13,76$, $p<0,001$), siendo el grupo menos ansioso el que presenta menores niveles de corticosterona ($p<0,001$) en general. No obtuvimos efecto significativo en los siguientes análisis: a tiempo 0, 'Ansiedad' ($F_{2,52}=1,24$, n.s.) y 'Ansiedad' x 'Estrés' ($F_{2,52}=0,85$, n.s.); a los 90 minutos, 'Ansiedad' x 'Estrés' ($F_{2,43}=2,13$, n.s.).

Dentro del grupo de animales estresados, las ratas HA mostraron niveles de corticosterona significativamente mayores que las LA y que las IA en este el punto, tal y como confirmó el análisis *a posteriori* ($p<0,001$ para ambos). Si analizamos lo que ocurre para el último valor dentro de los animales estresados, vemos que los HA no son tan eficaces como los LA y los IA en la recuperación de sus niveles basales de corticosterona ($p<0,001$ para ambos).

Cuando analizamos por separado la reacción del eje HPA dentro del grupo 'Control', a los 90 minutos obtenemos que las ratas HA han recuperado peor sus niveles basales de corticosterona manteniéndose significativamente más altos que los de las ratas

LA ($p=0,039$).

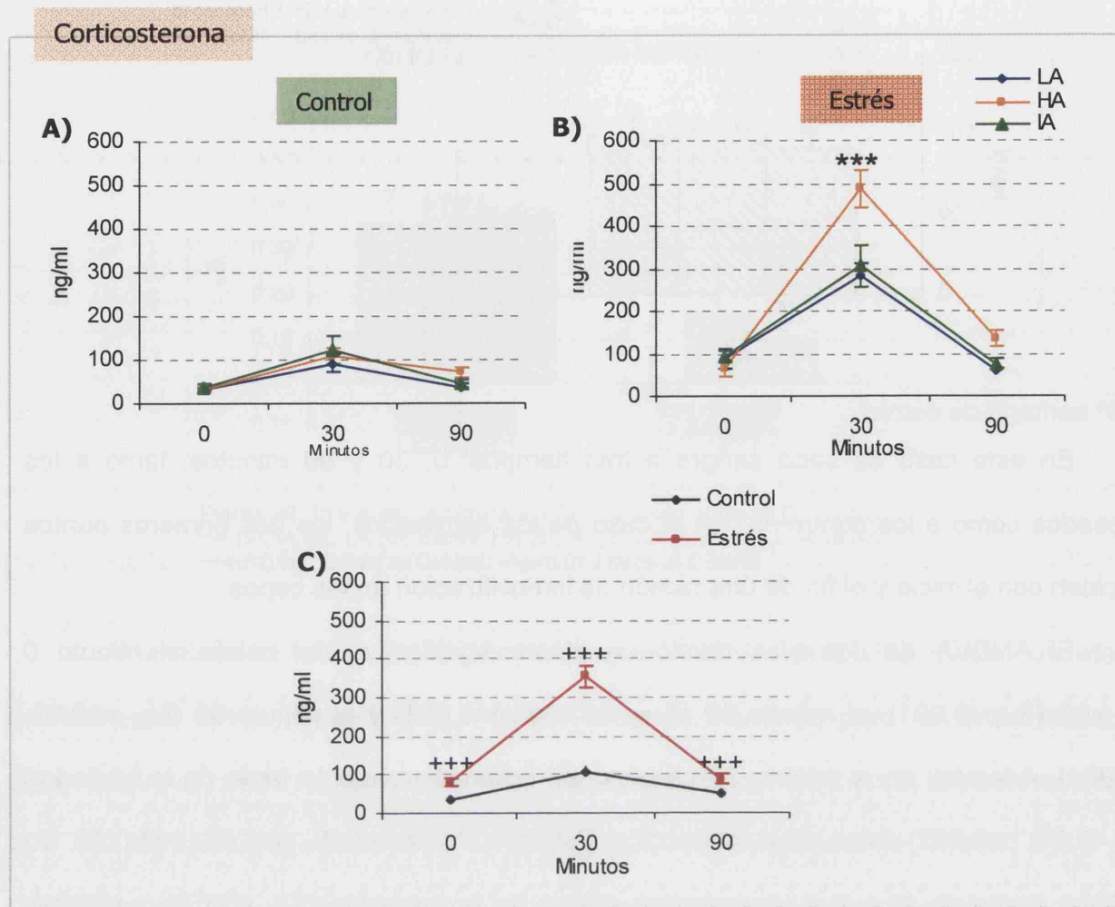


Figura 42. Niveles plasmáticos de corticosterona. La sangre se obtuvo en tres puntos distintos, 0, 30 y 90 minutos. A) Controles: HA(9), IA (9-11), LA (8-9). B) Estrés: HA (9-7), IA (6-9), LA (7-9). C) comparación Controles - Estrés. * $p<0.05$ HA vs LA. +++ $p<0.001$ Estrés vs Control.

- 4ª semana de estrés: sacrificio

Se tomó la sangre del tronco al ser sacrificados los animales.

- Sacrificio de las ratas viejas

A los 24 meses las ratas viejas se sacrificaron y se tomó sangre del tronco.

El ANOVA reveló un efecto significativo del estrés ($F_{2,93}=4,49$, $p=0,037$), presentando los animales estresados menores niveles de corticosterona en el momento del sacrificio; un efecto de la interacción 'Estrés' x 'Envejecimiento' ($F_{1,93}=25,39$, $p<0,001$). No se encontró efecto para los siguientes factores: 'Envejecimiento' ($F_{1,93}=1,14$, n.s.), 'Ansiedad' ($F_{2,93}=0,45$, n.s.), 'Envejecimiento' x 'Ansiedad' ($F_{2,93}=0,01$, n.s.), 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,93}=0,43$, n.s.), "Estrés x Ansiedad x Envejecimiento" ($F_{1,93}=2,34$, n.s.)

Al analizar los animales jóvenes por separado, el ANOVA nos mostró un efecto del estrés ($F_{1,46}=4.37$, $p=0,042$), que indica que los animales estresados mostraron valores de

corticosterona superiores a los animales controles tras el sacrificio. Si nos centramos en el grupo 'Viejos', tenemos un efecto del estrés ($F_{1,47}=25,07$, $p<0,001$), donde los animales controles parecen liberar más corticosterona que los estresados en el momento del sacrificio. Centrándonos en el grupo V-E, el *test de Tuckey* revela una diferencia significativa entre los animales LA e IA ($p=0,033$).

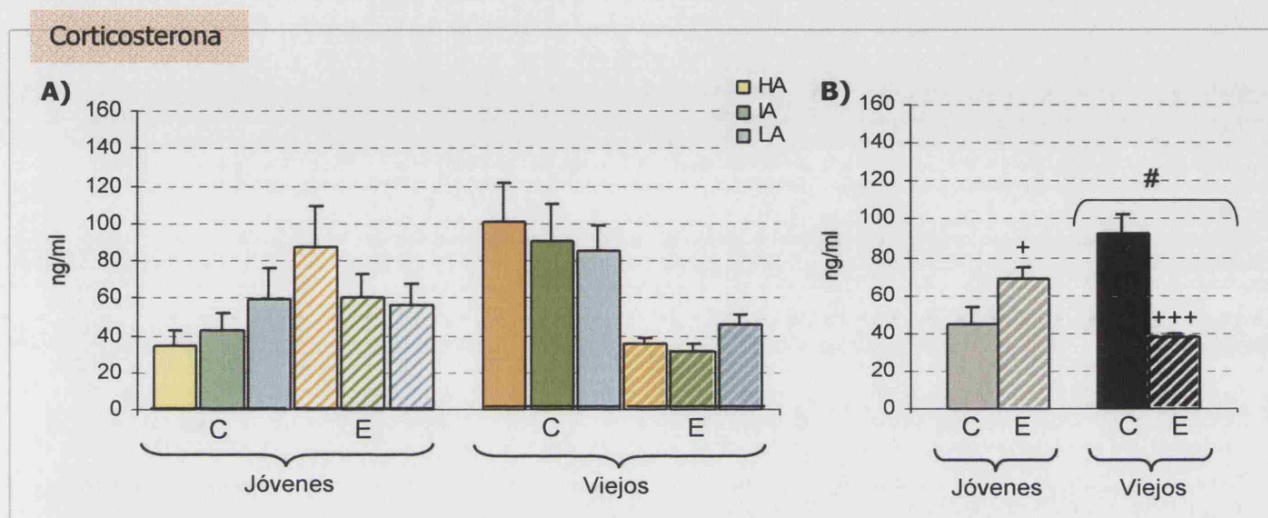


Figura 43. Niveles de corticosterona tras el sacrificio. *Jóvenes* (Control: HA(9), IA (10), LA (7); Estrés: HA(9), IA (9), LA (8)), *Viejos* (Control: HA(9), IA (10), LA (9); Estrés: HA(9), IA (8), LA (8)). + $p<0,05$ Estrés vs Control, +++ $p<0,001$ Estrés vs Control; # $p<0,05$ Viejos vs Jóvenes

➤ Niveles de receptores cerebrales

- **Hipocampo:** todos los ELISAs se hicieron a partir de homogenados de hipocampo salvo para NCAM y PSA-NCAM que se utilizaron los sinaptosomas.
- GRs: el ANOVA nos muestra un efecto significativo de la interacción 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,100}=3,38$, $p=0,038$) y una tendencia a la significación de la interacción 'Estrés' x 'Envejecimiento' ($F_{2,100}=3,28$, $p=0,073$). No se encontraron diferencias para los factores 'Envejecimiento' ($F_{1,100}=3,73$, n.s.), 'Estrés' ($F_{1,100}=1,78$, n.s.) o las siguientes interacciones: 'Envejecimiento' x 'Ansiedad' ($F_{2,100}=1,94$, n.s.) y 'Envejecimiento' x 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,100}=2,22$, n.s.).

Cuando analizamos el efecto del estrés en los jóvenes, de nuevo encontramos el efecto 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,54}=6,27$, $p=0,004$), aunque el subsiguiente *test de Dunnett* no confirma la diferencia entre los LA y los HA J-E.

Cuando analizamos el grupo de los animales viejos, el efecto del estrés se

Resultados

aproxima a la significación en cuanto a la expresión de GRs en el hipocampo de rata ($F_{1,46}=3,96$, $p=0,053$), tendiendo los animales estresados a tener mayores niveles de receptor que los no estresados.

- MRs: en este caso tenemos un efecto del envejecimiento sobre la expresión de MRs ($F_{1,102}=5,58$, $p=0,020$), indicando que en el envejecimiento disminuyen los niveles de MR en el hipocampo. No se encontraron más efectos sobre la expresión de MRs en el hipocampo ('Estrés': $F_{1,102}=0,1$, n.s.; 'Ansiedad': $F_{2,102}=0,55$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Estrés': $F_{1,102}=0,07$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Ansiedad': $F_{2,102}=0,13$, n.s.; 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,102}=2,32$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,102}=0,51$, n.s.).

- FGF: con respecto a los niveles de FGF hipocampales, el estrés disminuye en general los niveles de dicha proteína ($F_{21,99}=3,98$, $p=0,049$), confirmándose este hecho al analizar independientemente el grupo de ratas viejas ($F_{1,46}=4,08$, $p=0,049$). No se encontraron más efectos ('Envejecimiento': $F_{1,99}=1,51$, n.s.; 'Ansiedad': $F_{2,99}=0,56$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Estrés': $F_{1,99}=1,84$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Ansiedad': $F_{2,99}=0,6$, n.s.; 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,99}=1,7$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,99}=0,47$, n.s.).

- FGF-R1: al analizar la expresión de dicho receptor en homogenados de hipocampo de rata obtuvimos efectos estadísticamente significativos del estrés ($F_{1,99}=4,04$, $p=0,047$), de la ansiedad ($F_{2,99}=9,95$, $p<0,001$), del envejecimiento ($F_{1,99}=3,18$, $p<0,001$) y de la interacción entre la ansiedad y el envejecimiento ($F_{2,99}=3,29$, $p=0,041$). Así, las ratas menos ansiosas presentan menores niveles que las HA ($p<0,001$) del receptor en el hipocampo y por otro lado, el envejecimiento y el estrés tienden a aumentar la expresión de FGF-R1 hipocampal. Sin embargo, el ANOVA no reveló un efecto significativo de las interacciones 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,99}=1,5$, n.s.), 'Envejecimiento' x 'Estrés' ($F_{1,99}=0,56$, n.s.) o 'Envejecimiento' x 'Ansiedad' x 'Estrés' ($F_{2,99}=0,13$, n.s.).

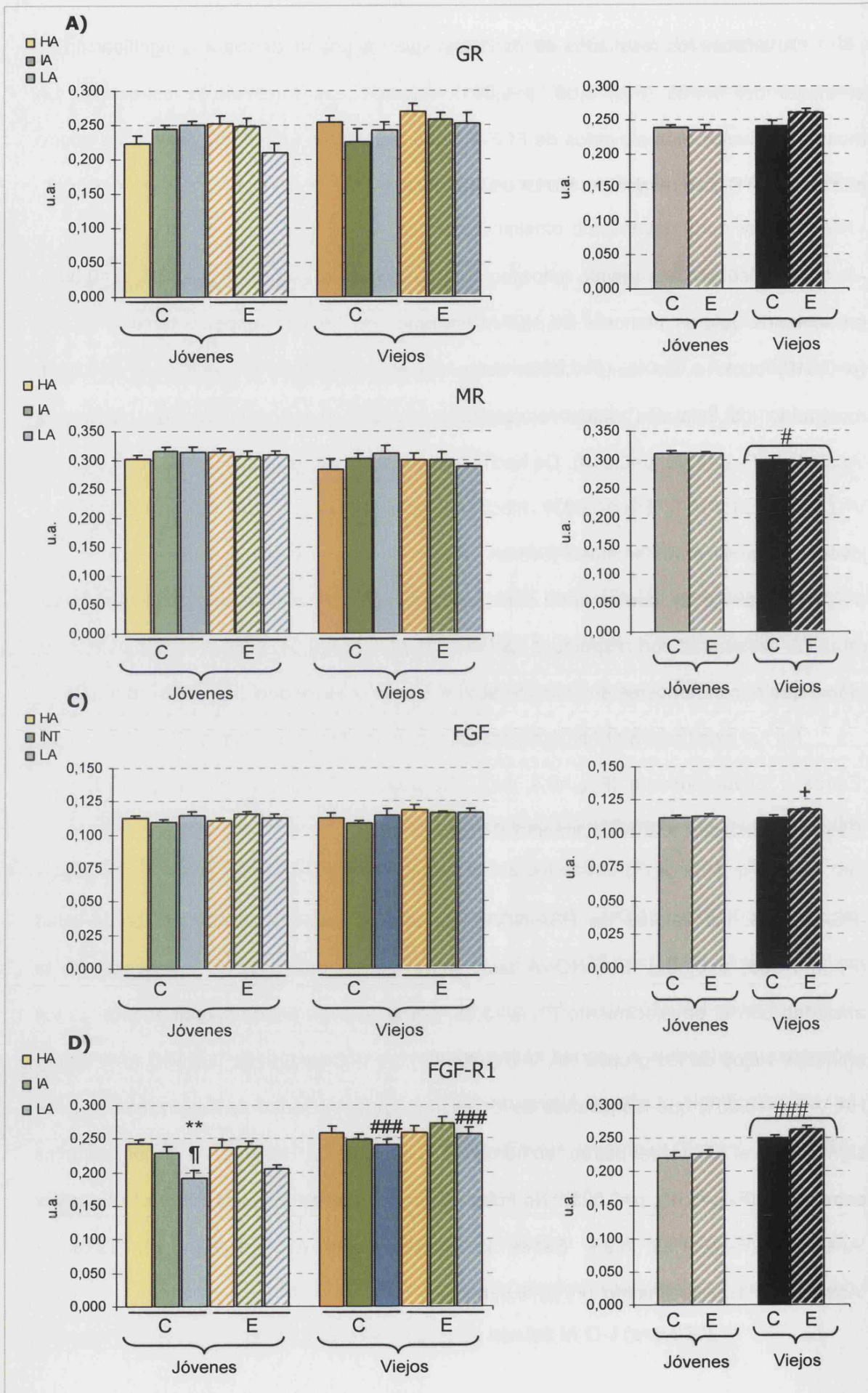
Dentro de los jóvenes, hay un efecto significativo de la ansiedad ($F_{2,52}=12,77$, $p<0,001$), mostrando los animales LA controles, niveles menores del receptor en comparación tanto con los HA C-J ($p=0,003$) como con los IA C-J ($p=0,038$).

Al analizar los resultados de los viejos, aparece una tendencia a la significación en el efecto del estrés ($F_{1,47}=3,68$, $p=0,061$). Además, las ratas viejas estresadas LA mostraron niveles más elevados de FGF-R1 que las LA J-E ($p=0,006$), y lo mismo ocurre con las LA V-C, con respecto a las LA J-C ($p=0,010$).

- NCAM: el ANOVA reveló un efecto tanto de la ansiedad ($F_{2,98}=6,08$, $p=0,003$), presentando valores menores de NCAM los animales LA con respecto tanto a los HA ($p=0,010$) como a los IA ($p=0,033$), como del envejecimiento ($F_{1,98}=107,19$, $p<0,001$), mostrando los animales viejos valores incrementados, y de la interacción 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,98}=4,58$, $p=0,013$). De hecho, los animales viejos tanto HA V-C ($p=0,002$), IA V-C ($p=0,002$) y IA V-E ($p=0,003$) mostraron niveles más elevados que sus homólogos jóvenes. Al analizar los animales jóvenes, obtuvimos un efecto significativo de la ansiedad ($F_{2,51}=4,83$, $p=0,012$), confirmando el *test deTuckey* la mayor expresión de NCAM de las ratas LA estresadas con respecto a las HA estresadas ($p=0,047$). Dentro de los viejos, el efecto que encontramos es el de la interacción 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,53}=3,97$, $p=0,025$).

No fue significativo el ANOVA para los siguientes factores: 'Estrés' ($F_{1,98}=0,94$, n.s.), 'Estrés' x 'Envejecimiento' ($F_{1,98}=0,4$, n.s.), 'Ansiedad' x 'Envejecimiento' ($F_{2,98}=0,78$, n.s.), 'Estrés' x 'Ansiedad' x 'Envejecimiento' ($F_{2,98}=0,17$, n.s.).

-PSA-NCAM: los valores de PSA-NCAM en el hipocampo incrementan con la edad ($F_{1,100}=74,58$, $p<0,001$). El ANOVA también reveló un efecto de la interacción de la ansiedad con el envejecimiento ($F_{2,100}=3,35$, $p=0,039$). Así, tienen niveles más altos los animales viejos de los grupos HA V-C ($p<0,001$), IA V-C ($p=0,017$), LA V-C ($p=0,015$) y HA V-E ($p=0,001$) que los jóvenes de los mismos grupos. Dentro de los jóvenes se hace significativo el efecto del estrés, aumentando los niveles de PSA-NCAM en los animales estresados ($F_{1,52}=5,46$, $p=0,023$). No hubo efecto del 'Estrés' ($F_{1,100}=1,87$, n.s.), 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,100}=1,23$, n.s.), 'Estrés' x 'Envejecimiento' ($F_{1,100}=2,92$, n.s.), 'Estrés' x 'Ansiedad' x 'Envejecimiento' ($F_{2,100}=0,6$, n.s.).



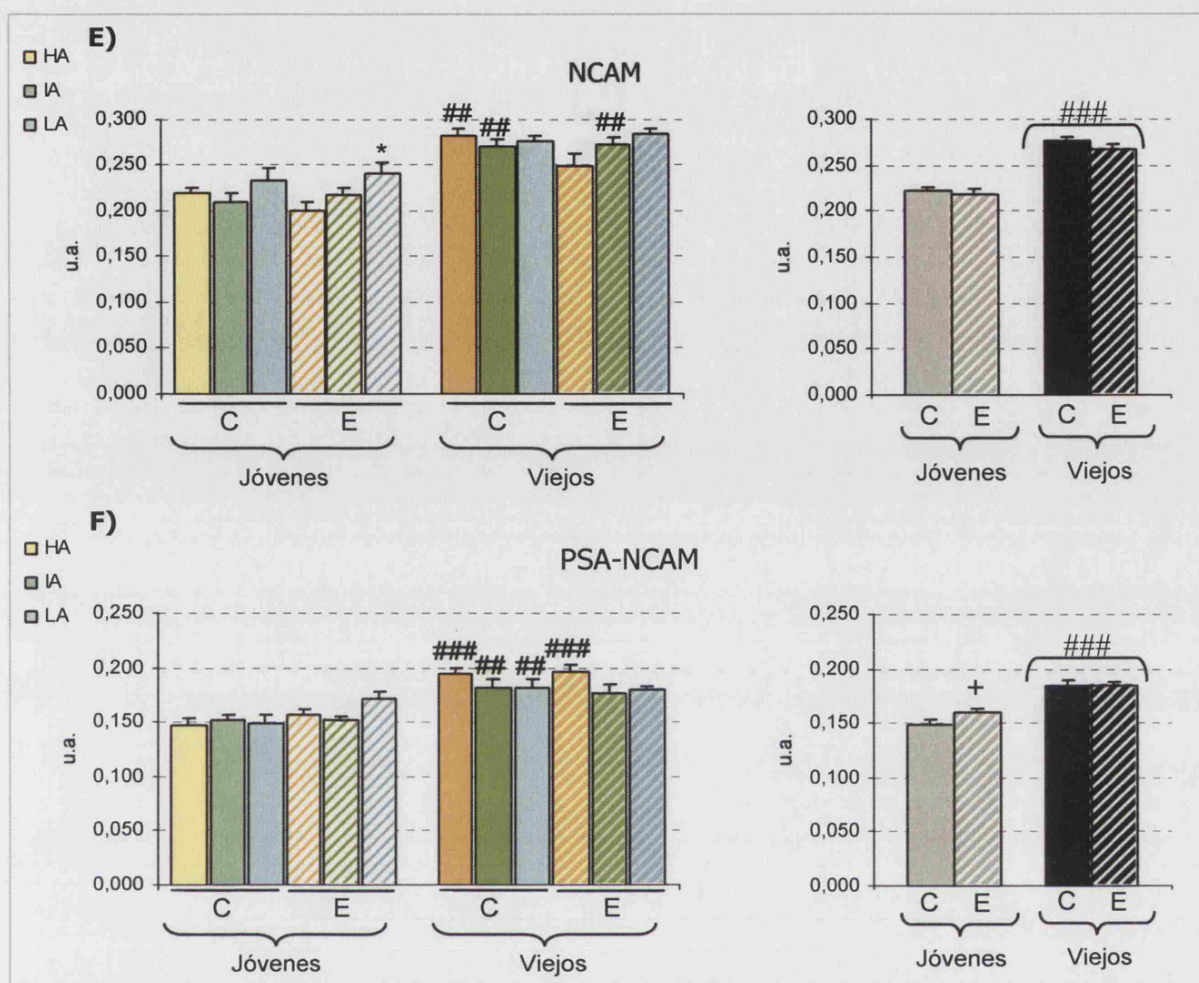


Figura 44. Niveles de receptores hipocámpales. **A) GR:** Jóvenes (Control: HA(10), IA (11), LA (9); Estrés: HA(10), IA (10), LA (10)), Viejos (Control: HA(10), IA (9), LA (9); Estrés: HA(8), IA (9), LA (7)). **B) MR:** Jóvenes (Control: HA(9), IA (10), LA (10); Estrés: HA(9), IA (10), LA (10)), Viejos (Control: HA(10), IA (10), LA (9); Estrés: HA(10), IA (9), LA (8)). **C) FGF:** Jóvenes (Control: HA(9), IA (11), LA (10); Estrés: HA(10), IA (9), LA (10)), Viejos (Control: HA(10), IA (9), LA (8); Estrés: HA(9), IA (8), LA (8)). **D) FGF-R1:** Jóvenes (Control: HA(9), IA (11), LA (9); Estrés: HA(10), IA (9), LA (10)), Viejos (Control: HA(10), IA (9), LA (9); Estrés: HA(9), IA (8), LA (8)). **E) NCAM:** Jóvenes (Control: HA(9), IA (10), LA (10); Estrés: HA(10), IA (10), LA (8)), Viejos (Control: HA(9), IA (10), LA (9); Estrés: HA(10), IA (8), LA (7)). **F) PSA-NCAM:** Jóvenes (Control: HA(9), IA (11), LA (10); Estrés: HA(10), IA (9), LA (9)), Viejos (Control: HA(9), IA (10), LA (9); Estrés: HA(9), IA (8), LA (8)).

Los valores representan la media \pm el E.M.E

* $p < 0.05$ LA vs HA, ** $p < 0.01$ LA vs HA; † $p < 0.05$ LA vs IA; + $p < 0.05$ Estrés vs Control; ## $p < 0.01$ Viejos vs Jóvenes, ### $p < 0.001$ es

- **Corteza frontal:** todos los ELISAs se hicieron a partir de homogenados de corteza frontal salvo para NCAM y PSA-NCAM que se utilizaron los sinaptosomas.

- GRs: la estadística nos muestra un efecto del envejecimiento ($F_{1,103}=31,61$, $p < 0,001$) así como un efecto conjunto del estrés y el envejecimiento ($F_{1,103}=5,87$, $p = 0,017$), indicando que la expresión de dichos receptores se encuentra disminuida en los animales viejos y que el envejecimiento afecta de forma más importante a los animales estresados. El análisis *a posteriori* nos muestra además que los animales HA V-E tienen significativamente menos GRs en corteza que los HA J-E ($p = 0.003$), lo que apunta a que

este grupo ha sido el más vulnerable al efecto del envejecimiento.

No se encontraron otras diferencias significativas ('Estrés': $F_{1,103}=3,41$, n.s.; 'Ansiedad': $F_{2,103}=0,55$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Ansiedad': $F_{2,103}=2,62$, n.s.; 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,103}=0,9$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,103}=0,29$, n.s.).

- MRs: los receptores de mineralocorticoides parecen incrementar su expresión en el envejecimiento ($F_{1,102}=27,49$, $p<0,001$). Dentro de los jóvenes, encontramos tanto un efecto del estrés ($F_{1,51}=4,18$, $p=0,046$), el cual induce una bajada en los niveles de estos receptores en la corteza frontal, así como de la interacción "Estrés x Ansiedad" ($F_{2,51}=3,79$, $p=0,029$).

El resto de comparaciones no dieron lugar a diferencias significativas ('Estrés': $F_{1,102}=1,18$, n.s.; 'Ansiedad': $F_{2,102}=0,44$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Estrés': $F_{1,103}=0,25$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Ansiedad': $F_{2,102}=0,49$, n.s.; 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,102}=2,04$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,102}=0,1$, n.s.)

- FGF: de nuevo encontramos un efecto del envejecimiento ($F_{1,100}=21,25$, $p<0,001$) que tiende a incrementar los niveles de esta proteína neurotrófica en la corteza frontal de los animales viejos en relación con los jóvenes. Aparece además una tendencia a la significación para la interacción entre el estrés y la ansiedad ($F_{2,100}=2,62$, $p=0,074$) y para la interacción entre la ansiedad y el envejecimiento ($F_{2,100}=3,00$, $p=0,054$). Sin embargo el ANOVA no reveló efecto del factor 'Estrés' ($F_{1,100}=0,005$, n.s.) y 'Ansiedad' ($F_{2,100}=1,87$, n.s.) ni de las siguientes interacciones: 'Envejecimiento' x 'Estrés' ($F_{2,100}=0,008$, n.s.) y 'Envejecimiento' x 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,100}=3$, n.s.). Al analizar por separado el grupo de animales jóvenes, vemos un efecto de la ansiedad ($F_{2,52}=4,15$, $p=0,021$) que se refleja en una tendencia a la baja en los animales LA con respecto a los HA ($p=0,019$). También hay un efecto significativo de la interacción 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,52}=3,46$, $p=0,039$).

- FGF-R1: los animales viejos expresan menores niveles de receptor de tipo I para FGF que los jóvenes, tal y como confirma la estadística ($F_{1,98}=63,10$, $p<0,001$). También obtuvimos un efecto de la interacción entre el estrés y el envejecimiento ($F_{1,98}=4,17$,

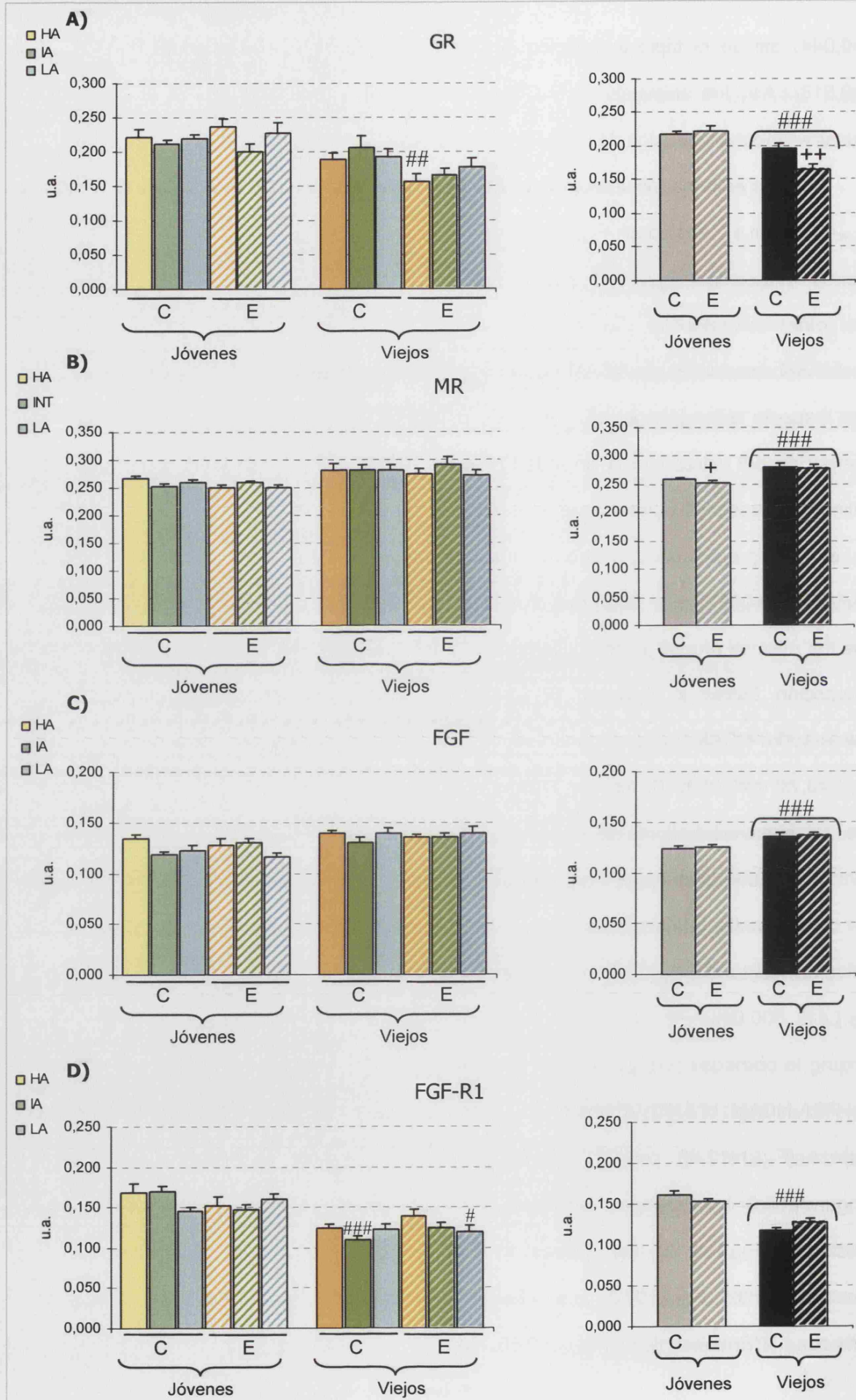
$p=0,044$) así de la triple interacción “Estrés x Ansiedad x Envejecimiento” ($F_{2,98}=4,18$, $p=0,018$). Así, los animales LA V-C ($p=0,019$), IA V-C ($p<0,001$) y LA V-E ($p=0,038$) muestran menos expresión de FGF-R1 que sus homólogos jóvenes.

No se hallaron más efectos significativos ('Envejecimiento': $F_{1,98}=63,1$, n.s.; 'Estrés': $F_{1,98}=0,006$, n.s.; 'Ansiedad': $F_{2,98}=1,96$, n.s.; 'Envejecimiento' x 'Ansiedad': $F_{2,98}=0,79$, n.s.; 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,98}=0,45$, n.s.).

- NCAM: los niveles de NCAM en la corteza están aumentados en los animales viejos con respecto a los jóvenes ($F_{1,102}=71,47$, $p<0,001$). El ANOVA mostró un efecto de la interacción del estrés con la ansiedad ($F_{2,102}=4,16$, $p=0,018$) y una tendencia a que los animales estresados tengan incrementados sus niveles de NCAM ($F_{1,102}=3,37$, $p=0,069$). Así el análisis *a posteriori* mostró que los animales HA V-C ($p=0,003$), IA C-E ($p=0,014$) y LA V-E ($p=0,005$) presentaron mayores niveles de esta molécula de adhesión en corteza que los mismos grupos jóvenes. Dentro del grupo “Jóvenes” hay un efecto significativo la interacción 'Estrés' x 'Ansiedad' ($F_{2,54}=5,72$, $p=0,006$) y una tendencia a un efecto del estrés sobre NCAM, incrementando sus niveles en la corteza de los animales estresados ($F_{2,54}=3,71$, $p=0,059$). El *test de Tuckey* confirmó que las ratas jóvenes HA estresadas presentan mayores valores de NCAM que las HA controles ($p=0,004$).

No hubo diferencias significativas causadas por la ansiedad ($F_{2,102}=0,04$, n.s.), ni por las siguientes interacciones: 'Estrés' x 'Envejecimiento' ($F_{1,102}=0,15$, n.s.), 'Ansiedad' x 'Envejecimiento' ($F_{2,102}=0,11$, n.s.), 'Estrés' x 'Ansiedad' x 'Envejecimiento' ($F_{2,102}=0,58$, n.s.).

- PSA-NCAM: el ANOVA mostró un efecto a la alza en los niveles de PSA-NCAM en la corteza ($F_{1,101}=12,68$, $p=0,001$) en los animales viejos pero no encontró efecto para ninguno de los demás factores o interacciones ('Estrés': $F_{1,101}=0,002$, n.s. 'Ansiedad': $F_{2,101}=0,12$, n.s.; 'Estrés' x 'Envejecimiento': $F_{1,101}=0,31$, n.s.; 'Ansiedad' x 'Envejecimiento': $F_{2,101}=0,05$, n.s.; 'Estrés' x 'Ansiedad': $F_{2,101}=0,48$, n.s.; 'Estrés' x 'Ansiedad' x 'Envejecimiento': $F_{2,101}=0,66$, n.s.).



Resultados

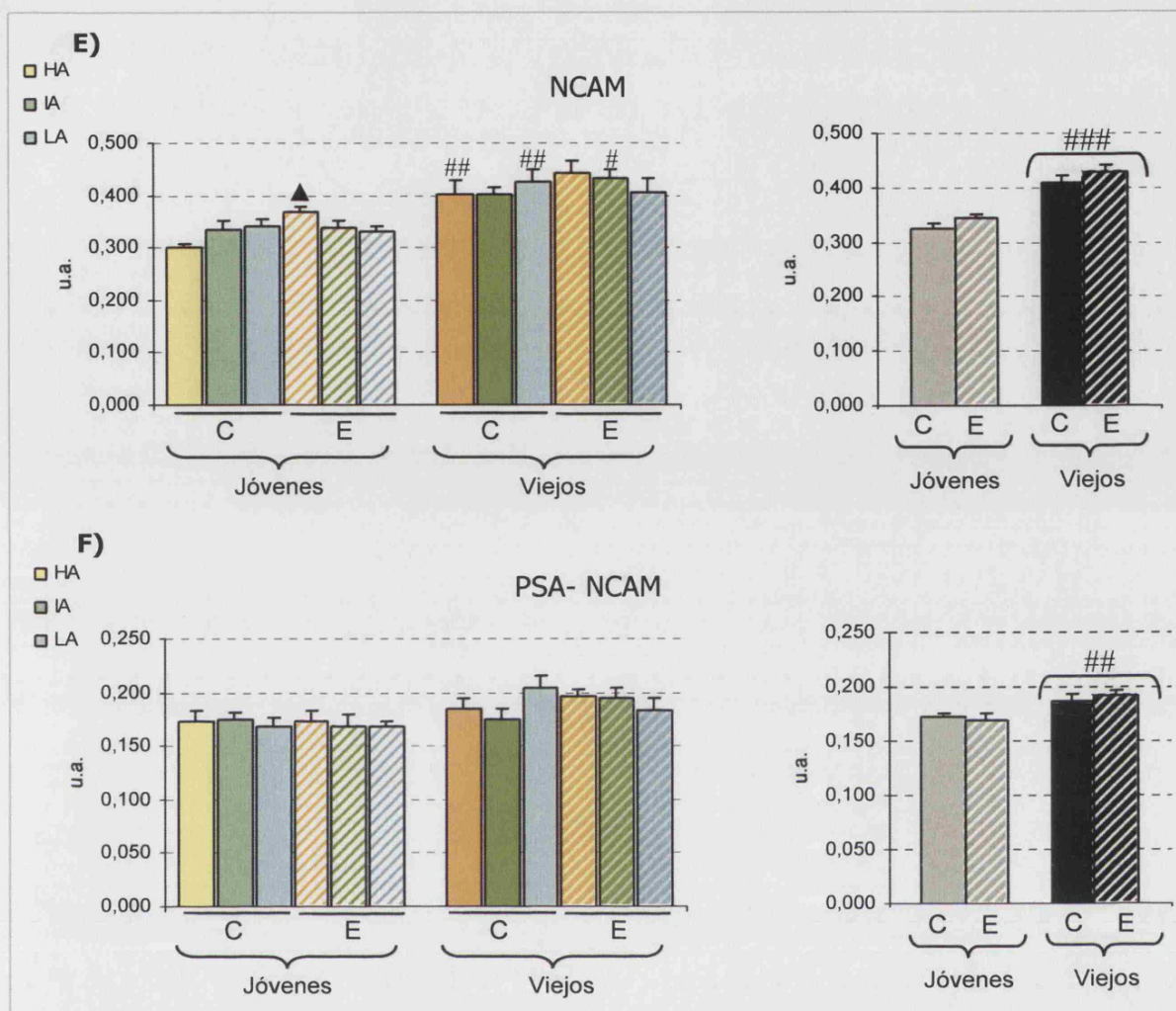


Figura 45. Niveles de receptores en la corteza frontal. **A) GR:** Jóvenes (Control: HA(8), IA (11), LA (10); Estrés: HA(10), IA (9), LA (10)), Viejos (Control: HA(10), IA (10), LA (9); Estrés: HA(10), IA (9), LA (8)). **B) MR:** Jóvenes (Control: HA(9), IA (10), LA (10); Estrés: HA(9), IA (10), LA (10)), Viejos (Control: HA(10), IA (10), LA (9); Estrés: HA(10), IA (9), LA (8)). **C) FGF:** Jóvenes (Control: HA(8), IA (10), LA (10); Estrés: HA(10), IA (10), LA (10)), Viejos (Control: HA(9), IA (10), LA (9); Estrés: HA(9), IA (9), LA (8)). **D) FGF-R1:** Jóvenes (Control: HA(9), IA (11), LA (9); Estrés: HA(10), IA (10), LA (9)), Viejos (Control: HA(9), IA (10), LA (8); Estrés: HA(9), IA (8), LA (8)). **E) NCAM:** Jóvenes (Control: HA(10), IA (11), LA (9); Estrés: HA(10), IA (10), LA (10)), Viejos (Control: HA(10), IA (9), LA (9); Estrés: HA(10), IA (8), LA (8)). **F) PSA-NCAM:** Jóvenes (Control: HA(10), IA (10), LA (10); Estrés: HA(10), IA (10), LA (9)), Viejos (Control: HA(10), IA (10), LA (8); Estrés: HA(10), IA (10), LA (9)).

+p<0.05 Estrés vs Control; ▲p<0.05 J-E vs J-C; ##p<0.01 Viejos vs Jóvenes, ###p<0.001 Viejos vs Jóvenes

2. Estudio del efecto del FGL sobre el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica. Papel neuroprotector del FGL frente al daño inducido por el estrés crónico.

2.1. Efecto del FGL en el aprendizaje y la memoria espacial

- Entrenamiento: 4 ensayos de 120 segundos durante 2 días

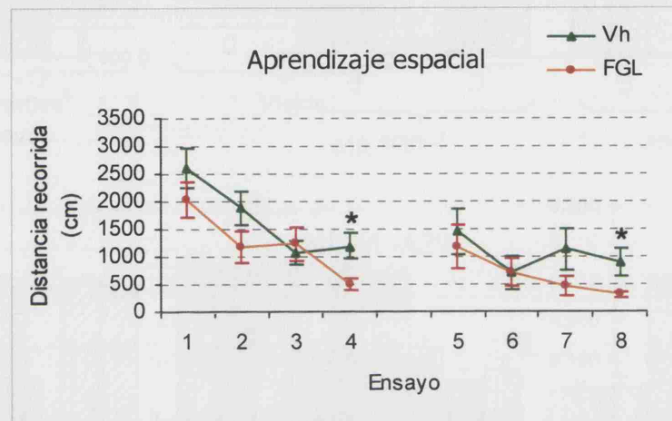


Figura 46. Distancia recorrida a la plataforma escondida en el entrenamiento.

* $p < 0.05$ entre grupos. Vehículo (Vh) (9), FGL (9)

Como se observa en la Figura 46, ambos grupos de animales aprenden dónde está localizada la plataforma a lo largo de los ensayos, lo cual fue confirmado por un ANOVA de medidas repetidas para cada condición (Vehículo: $F_{7,8}=6$; $p=0,02$; FGL: $F_{7,8}=14,14$; $p=0,06$). Al analizar las diferencias entre grupos, el ANOVA de medidas repetidas indicó una tendencia a que las ratas tratadas con FGL recorrieran menos distancia para encontrar la plataforma ($F_{1,16}=3,46$; $p=0,081$) en el primer día de entrenamiento, pero no así en el segundo ($F_{1,16}=2,09$; $p=0,168$). La comparación de la distancia recorrida por cada grupo experimental en cada uno de los ensayos puso de manifiesto que las ratas tratadas con FGL recorrieron menos distancia hasta alcanzar la plataforma en el cuarto ($t_{16}=2,80$; $p=0,02$) ensayo del primer y segundo día ($t_{16}=2,36$; $p=0,04$) (octavo ensayo de entrenamiento).

Analizamos también el tiempo que los animales nadaron por el borde exterior del laberinto y encontramos que los sujetos que habían sido tratados con FGL permanecieron menos tiempo en dicha zona a aquellos a los que se administró vehículo en el ensayo 2 ($t_{16}=2,40$, $p=0,029$), en el ensayo 4 ($t_{16}=2,40$, $p=0,029$), y en el ensayo 8 ($t_{16}=2,67$, $p=0,017$).

en comparación con aquellos a los que se administró vehículo.

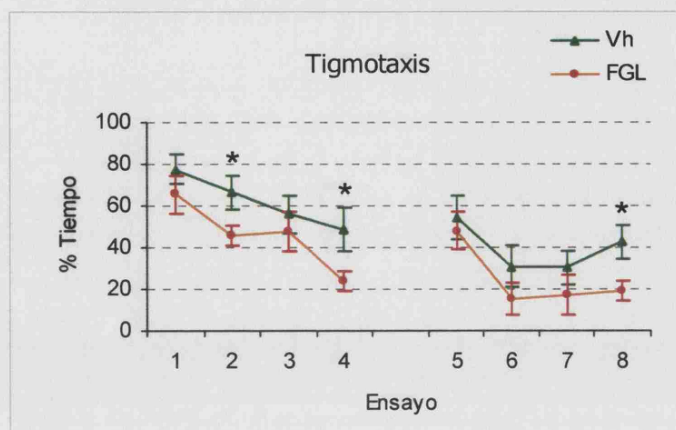


Figura 47 Porcentaje de tiempo nadado por el borde del laberinto en el entrenamiento del LAM.

* $p < 0.05$ entre grupos. Vehículo (Vh) (9), FGL (9)

- Prueba de memoria: un ensayo de 90 segundos

No se encontraron diferencias en el tiempo que los animales nadaron en el cuadrante diana ni en el índice de memoria $Q1/Q1+Q3$. Pero como puede observarse en la tabla, los animales tratados con FGL nadaron significativamente menos tiempo por la zona de la pared del laberinto que los tratados con vehículo ($t_{16}=1,73$, $p=0,031$).

Prueba de memoria – 30 segundos

Parámetro	Grupo	
	Vh	FGL
% Tiempo en el exterior de la piscina	53,07 ± 6,60	35,38 ± 6,54
% Tiempo en Q1	32,44 ± 4,79	35,29 ± 5,08
Q1/Q1+Q3	0,62 ± 0,09	0,65 ± 0,07

Tabla 6. Resultados de la prueba de memoria en el LAM durante los primeros 30 segundos. Los valores representan la media ± el E.M.E. Vh (9), FGL (9). Q1 es el cuadrante diana y Q3 el cuadrante opuesto a éste.

* $p < 0.05$ FGL vs Vh.

2.2. Efecto de la administración de FGL sobre el número de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo

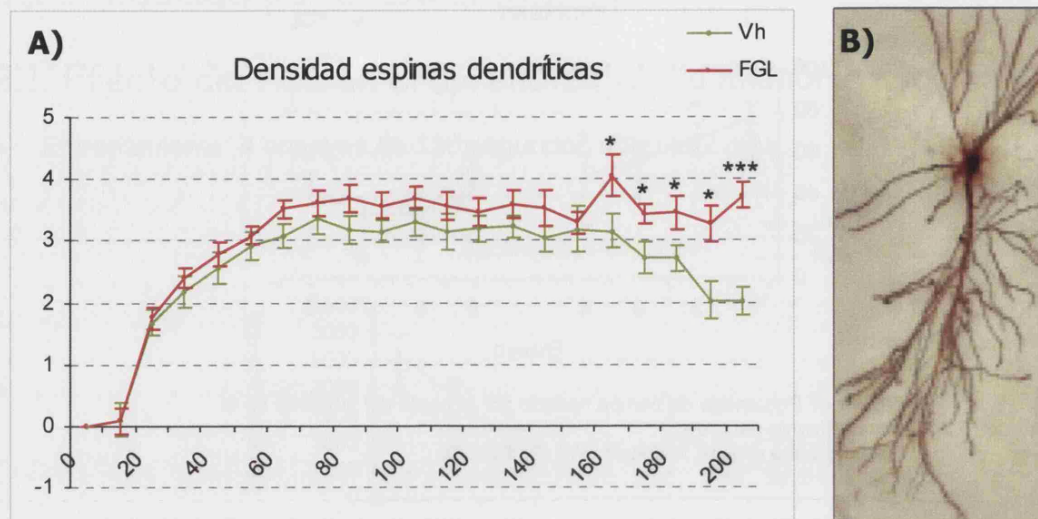


Figura 48. A) Número de espinas dendríticas en el GD del hipocampo. Vh (3-10), FGL (6-10). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ FGL vs Vh utilizando la *t* de Student. B) Fotografía de una neurona de CA1 marcada con DAB para la cuantificación de espinas (x20).

El conteo de las espinas marcadas con DAB reveló que a pesar de no encontrar ningún efecto del tratamiento en las espinas apicales, el FGL incrementó la densidad de espinas basales, más específicamente en las 50 últimas micras del árbol dendrítico (190-200 mm, $p < 0,05$; 190-200 mm $p < 0,001$).

2.3. El FGL previene el daño cognitivo provocado por el estrés crónico y asociado al envejecimiento.

2.3.1. Efecto del ECI en la ganancia de peso de los animales

Durante el protocolo de estrés se produjo una reducción en la ganancia de peso de los animales estresados. El ANOVA de medida repetidas mostró un efecto significativo del efecto del estrés ($F_{1,49} = 35,21$, $p < 0,001$) durante el tiempo que duró el ECI. No hubo efecto significativo del tratamiento con FGL ($F_{1,49} = 1,22$, n.s.) ni de la interacción entre el estrés y el tratamiento ($F_{1,49} = 0,33$, n.s.).

Tres semanas después de concluir el estrés, desapareció la diferencia entre grupos en la ganancia de peso ($F_{1,49} = 3,34$, n.s.).

2.3.2. Efecto protector del FGL en el aprendizaje y la memoria espacial

Seis meses después del ECI durante el cual las ratas recibieron o bien el péptido FGL o vehículo, los animales fueron entrenados en el laberinto acuático de Morris y evaluados tanto su aprendizaje como su memoria espacial.

- Entrenamiento: 3 ensayos de 90 segundos durante 3 días

Todas las ratas entrenadas en el LAM aprendieron la localización de la plataforma escondida, tal y como indica la progresiva disminución en las distancias recorridas a lo largo de los ensayos ($F_{8,38} = 16,44$, $p < 0,001$). Mientras que ni el estrés ni el tratamiento afectaron al entrenamiento durante el primer día ('Estrés': $F_{1,44} = 0,22$, n.s.; 'Tratamiento': $F_{1,44} = 2,77$, $p = 0,10$) y el tercer día de entrenamiento ('Estrés': $F_{1,44} = 0,41$, n.s.; 'Tratamiento': $F_{1,44} = 0,78$, n.s.), durante el segundo día, los animales del grupo 'Control' aprendieron mejor que los estresados la localización de la plataforma ($F_{1,44} = 10,62$, $p = 0,002$). El análisis *a posteriori* reveló que las ratas estresadas inyectadas con vehículo durante 4 semanas, nadaron distancias mayores en el primer ensayo del segundo día que las ratas control, tratadas con vehículo ($p = 0,049$) y con FGL ($p = 0,054$), estando con estos últimos próximos a la diferencia significativa.

No se encontró un efecto ni del factor 'Estrés' ($F_{1,44} = 0,94$, n.s.) ni del factor 'Tratamiento' ($F_{1,44} = 0,23$, n.s.) ni de la interacción 'Estrés' x 'Tratamiento' ($F_{1,1} = 1,21$, n.s.) al analizar las velocidades a lo largo de los tres días de entrenamiento.

- Prueba de memoria: 1 ensayo de 60 segundos

Un día después del completar el entrenamiento, la memoria espacial fue medida en función del tiempo que los animales buscaron en el cuadrante donde había estado localizada la plataforma (Q1). En el análisis de los primeros 30 segundos, El ANOVA mostró una tendencia a la significación del estrés ($F_{1,44} = 3,58$, $p = 0,07$), un efecto significativo de la interacción 'Estrés' x 'Tratamiento' ($F_{1,1} = 4,83$, $p = 0,033$), pero no del tratamiento con FGL durante el estrés crónico ($F_{1,44} = 1,00$, n.s.). El *post hoc* confirmó que los animales E-Vh nadaron significativamente menos tiempo en el cuadrante diana que el resto de los grupos ($p < 0,05$ para todos los grupos). Sólo los animales estresados tratados

Resultados

con vehículo mostraron un déficit en la memoria espacial, ya que es el único grupo que no nada por encima del 25% de tiempo en el cuadrante Q1(C-Vh: $t_{11}=3,06$, $p=0,004$; C-FGL: $t_{11}=2,55$, $p=0,027$; E-Vh: $t_{12}=-0,91$, n.s.; E-FGL: $t_{11}=3,07$, $p=0,012$).

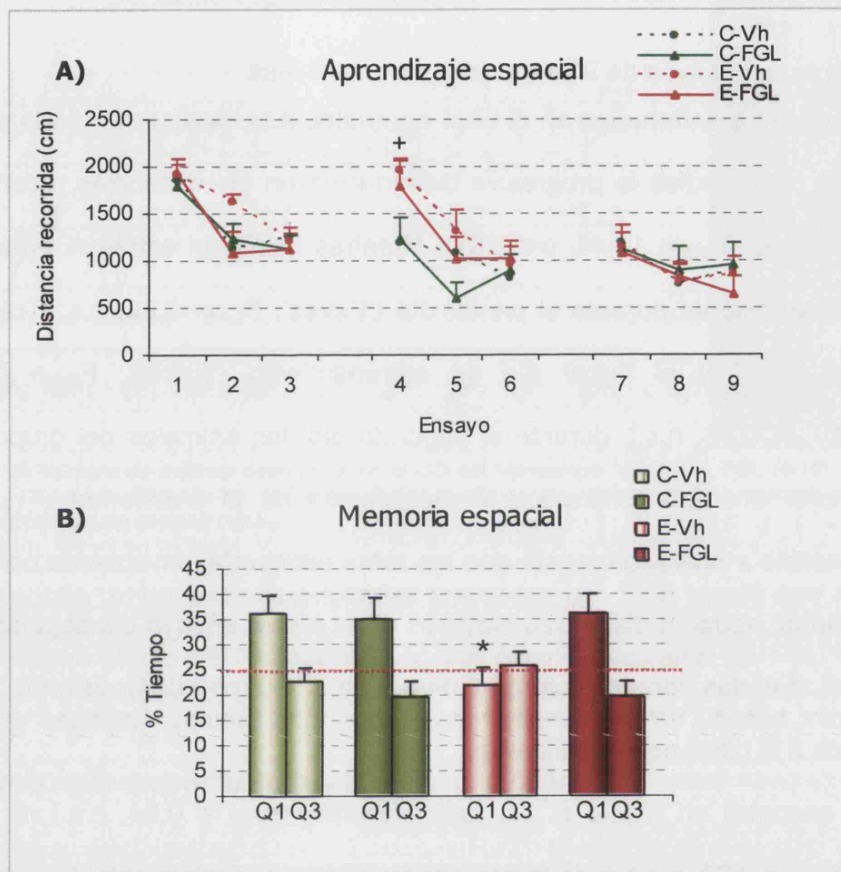


Figura 49 .Laberinto acuático de Morris: **A)** Distancia recorrida a la plataforma escondida en el entrenamiento. **B)** Porcentaje de tiempo nadado en el cuadrante diana (Q1) y el opuesto (Q3). (C): Vh (12), FGL (12); Estrés (E): Vh (12-13), FGL (10-11). + $p<0.05$ E-Vh- vs C-Vh. * $p<0.05$ E-Vh vs el resto de grupos

2.3.3. Efecto del estrés crónico y del FGL en la supervivencia celular en el hipocampo

➤ Supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo

Tres semanas después de las inyecciones de BrdU (6 semanas después de completar el entrenamiento en el LAM), se cuantificó el número de células BrdU positivas con morfología neuronal en el GD del hipocampo. El ANOVA reveló que un efecto significativo del tratamiento ($F_{1,20}=15,79$, $p=0,001$) y una tendencia a la significación del factor 'Estrés' ($F_{1,20}=3,67$, $p=0,07$). El análisis *a posteriori* reveló un descenso en el número de células nuevas nacidas en el GD en los animales que fueron sometidos a estrés y tratados con vehículo comparado el grupo E-FGL ($p=0,013$) y con el U-FGL ($p=0,002$).

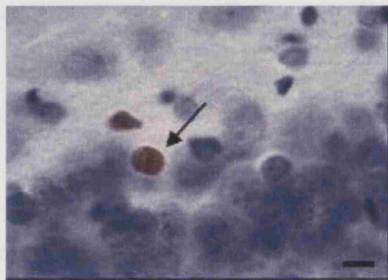


Figura 50. Célula BrdU positiva en el giro dentado del hipocampo ($\times 100$)

Además, quisimos comprobar la existencia de una correlación entre la memoria espacial evaluada en el LAM y la supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo. Hallamos una correlación positiva entre el tiempo que cada rata buscó en el cuadrante diana durante los primeros 30 segundos de la prueba de memoria y el número total de células BrdU positivas en el giro dentado ($r=0,505$, $p=0,012$).

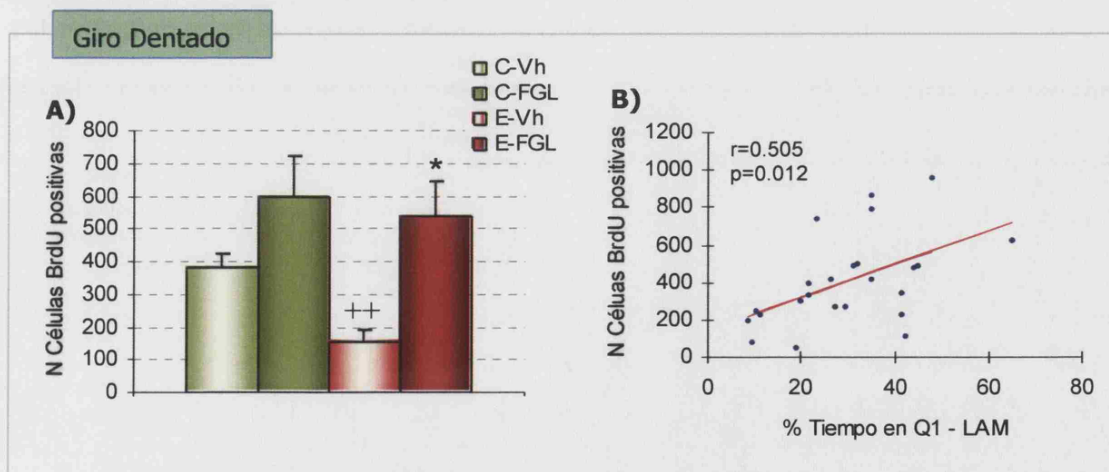


Figura 51 .Proliferación celular en el GD del hipocampo: **A)** Número de células BrdU postivas en el GD. Las barras representan la media \pm E.M.E. Control (C): Vh (7), FGL (6); Estrés: Vh (6), FGL (5). **B)** Correlación entre el número de células BrdU postivas en el GD y el porcentaje de tiempo que las ratas nadaron en el cuadrante diana (Q1) durante la prueba de memoria en el LAM.

* $p<0,05$, vs E-Vh, ++ $p<0,01$ E-Vh vs C-FGL (Tuckey HSD).

➤ Supervivencia celular en el hilus

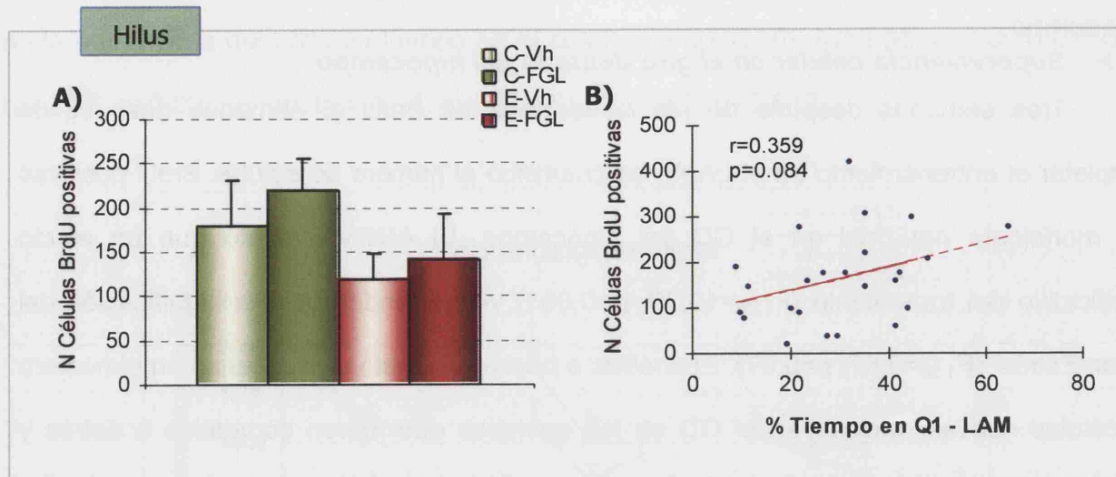


Figura 52 .Proliferación celular en el hilus del hipocampo: **A)** Número de células BrdU positivas en el GD. Las barras representan la media \pm E.M.E. Control (C): Vh (7), FGL (6); Estrés: Vh (6), FGL (5). Las barras representan la media \pm E.M.E. **B)** Correlación entre el número de células BrdU positivas en el hilus y el % de tiempo que las ratas nadaron en el cuadrante diana (Q1) durante la prueba de memoria en el LAM

La correlación entre las células BrdU positivas en el hilus y el porcentaje de tiempo que las ratas nadaron en Q1 sólo se aproximó a la significación ($r=0,359$, $p=0,084$).

2.3.4. Efecto del estrés crónico y del FGL en el número de células granulares del GD del hipocampo

Utilizando métodos de estereología caracterizamos el efecto del estrés y del tratamiento con FGL en el número total de células granulares del GD del hipocampo. El ANOVA reveló un efecto significativo del estrés ($F_{1,20}= 5,71$, $p=0,025$), el cual parece haber inducido una reducción en el número de células granulares en comparación con los controles, aunque el análisis *post hoc* no reveló diferencias significativas al comparar los grupos individualmente. En cambio, no se encontró ningún efecto del tratamiento ($F_{1,20}= 0,11$, n.s.) ni de la interacción entre factores ($F_{1,20}= 0,09$, n.s.).

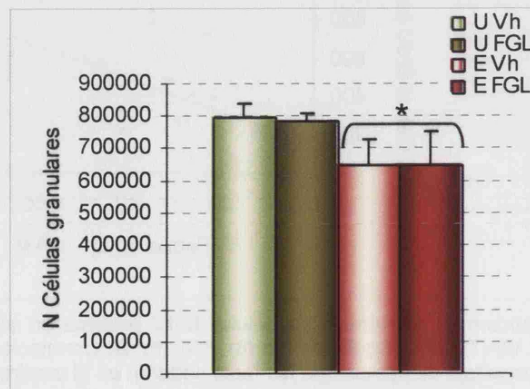


Figura 53. Número de células granulares en el GD del hipocampo. Control (C): Vh (7), FGL (6); Estrés: Vh (6), FGL (5). * $p<0.05$ Estrés vs Control.

2.3.5. Efecto del estrés crónico y del FGL en el volumen del hipocampo y del GD

Medidas volumétricas

	C-Vh	C-FGL	E-Vh	E-FGL
HT (mm ³)	72,79 ± 3,91	75,89 ± 4,75	70,54 ± 4,94	68,76 ± 0,34
GD (mm ³)	3,07 ± 0,22	3,09 ± 0,22	2,90 ± 0,17	2,97 ± 0,34

Tabla 7. Medidas del volumen total del hipocampo (HT) y del giro dentado (GD) en mm³ (Q3). Control (C): Vh (7), FGL (6); Estrés: Vh (6), FGL (5). Los valores representan la media ± el E.M.E.

Como se muestra en la Tabla 6 , el análisis del volumen de la capa granular del GD del hipocampo no mostró ningún efecto ni del estrés ($F_{1,20} = 0,37$, n.s.) ni del tratamiento ($F_{1,20} = 0,46$, n.s.) ni de la interacción ($F_{1,20} = 0,14$, n.s.). El volumen total del hipocampo tampoco se vió afectado por el estrés ($F_{1,20} = 1,17$, n.s.) o el tratamiento ($F_{1,20} = 0,20$, n.s.).

V. Discusión

1. Caracterización del modelo de ansiedad y estudio de la vulnerabilidad al daño inducido por el estrés crónico y/o asociado al envejecimiento

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían encontrado que ratas macho de la cepa Wistar con diferentes niveles de ansiedad mostraban distintas capacidades de aprendizaje y memoria, así como diferentes niveles bioquímicos de receptores de glucocorticoides en el hipocampo. En dichos estudios, se había dividido la población total de animales en dos subgrupos de ansiedad: HA y LA. Basándonos en dichos resultados, en esta primera parte del trabajo decidimos profundizar en el estudio de la posible interacción existente entre la ansiedad intrínseca de los animales y diversos tipos de aprendizaje y memoria pero utilizando tres subgrupos de ansiedad. También, quisimos saber si la ansiedad de los animales se mantenía en el tiempo y, por tanto, si podía ser considerada como un rasgo que pudiera influir en la vulnerabilidad de los animales al estrés crónico y a los efectos deletéreos causados por el envejecimiento.

Además, decidimos estudiar si algunos de los elementos del eje HHA que participan en las respuestas de ansiedad y estrés (como la corticosterona circulante, y los receptores de corticosteroides, tanto los GR como los MR), así como la activación del SNA, podrían ser candidatos a estar implicados en dichas diferencias. También decidimos investigar las posibles diferencias individuales en la expresión y modulación en los niveles de NCAM y NCAM polisializada, dada la implicación de estas moléculas en procesos de aprendizaje y memoria y del FGF y su receptor debido a su conocido papel neuroprotector.

1.1. Caracterización del modelo de ansiedad

Tal y como se había hecho en estudios previos en nuestro laboratorio, clasificamos a una población de ratas macho Wistar en tres subgrupos; los extremos de ansiedad de la población, HA y LA, y un tercer grupo que podríamos considerar de ansiedad media o población 'normal' en lo que a niveles de ansiedad se refiere, el grupo IA. Hoy en día se utilizan modelos animales de ansiedad generados a partir de líneas de cruzamiento

seleccionadas en función de su rasgo de ansiedad (Liebsch y cols, 1998;Landgraf y Wigger, 2002;Neumann y cols, 2005), los cuales difieren también en otra serie de parámetros conductuales. Así, la línea de ratas seleccionadas con altos niveles de ansiedad o HAB (del inglés, *high anxiety behaviour*) (Liebsch y cols, 1998;Ohl y cols, 2001;Bosch y cols, 2005;Frank y cols, 2006), muestran características similares a los síntomas que se relacionan en humanos con depresión y alteraciones de ansiedad (Keck, Jr. y cols, 2003). Por otro lado, la línea seleccionada con bajos niveles de ansiedad o LAB (del inglés, *low anxiety behaviour*) muestra un bajo índice de ansiedad incluso cuando se las compara con ratas Wistar no seleccionadas o 'normales' (Liebsch y cols, 1998;Ohl y cols, 2001;Bosch y cols, 2005). El estudio de una población de animales no seleccionados como el presentado en este trabajo, representa de una forma más real la heterogeneidad que se encuentra de forma natural en una población de individuos.

1.1.1. Caracterización bioquímica: niveles de corticosterona y glucosa

Como ya se ha mencionado, existen distintas estrategias de afrontamiento de las situaciones estresantes, las cuales podrían venir determinadas por diferencias a nivel fisiológico en el sistema de respuesta al estrés (Overli, 2007). Por ello nos interesaba evaluar los niveles basales de corticosterona y glucosa de los distintos subgrupos de animales como reflejo de la activación del eje HHA y del SNA, siendo ambos sistemas importantemente implicados en la fisiología de la ansiedad (Vingerhoets, 1985;Korte, 2001). Aunque no se encontraron diferencias en cuanto a los niveles basales de glucosa, observamos que las ratas clasificadas como menos ansiosas en el LCE, las LA, mostraron niveles de corticosterona basales significativamente mayores que los otros dos grupos, los cuales no diferían entre si. Es más, dichos valores correlacionaron positivamente y de forma significativa con el porcentaje de tiempo que los animales estuvieron explorando los brazos abiertos del aparato, corroborando datos de otros grupos (Pellow y cols, 1985). Sin embargo, aunque los niveles basales de corticosterona de las ratas más ansiosas sean más bajos, su sistema de retroalimentación negativa ha resultado ser menos eficiente que el de las LA tras un estrés moderado. Es más, en un estudio con líneas de ratas seleccionadas por su ansiedad (Landgraf y Wigger, 2002) se vio que los niveles basales

de corticosterona eran significativamente mayores en las ratas LAB que en las HAB (Veenema y cols, 2007) y, sin embargo, la respuesta del eje HHA ante un estrés moderado fue mayor en las ratas HAB que en las LAB (Landgraf y cols, 1999; Salome y cols, 2004).

Esta relación entre los niveles de corticosterona y la ansiedad también se ha visto en humanos. Un trabajo realizado recientemente con personas clasificadas en función de su rasgo de ansiedad en ansiosos y no ansiosos, mostró la existencia de diferencias en su sistema neuroendocrino durante un procedimiento de estrés psicosocial. En los individuos menos ansiosos los niveles de cortisol, tanto plasmático como salivar, eran más altos que los sujetos más ansiosos (Jezova y cols, 2004).

Se define como rasgo de ansiedad o ansiedad innata cuando nos referimos a una característica estable a lo largo del tiempo para un individuo dado, en contraposición a estado de ansiedad que refleja una situación transitoria y que puede ser provocada por fármacos o experiencias previas (Andreatini y Bacellar, 2000; Ohl y cols, 2001). En relación con el modelo estudiado, podemos sugerir que estamos ante un rasgo y no un estado de ansiedad basándonos tanto en los datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, que mostraron una correlación en el porcentaje de tiempo en los brazos del LCE realizado dos veces en el mismo aparato con un mes de diferencia sin ninguna manipulación adicional entre ambas pruebas (Herrero y cols, 2006), como en resultados de esta investigación. Como se discutirá con mayor detalle en el apartado 1.2.5., hemos comprobado que incluso tras un protocolo de estrés crónico impredecible de 28 días, las ratas mantuvieron su rasgo de ansiedad al ser re-evaluadas en la caja luz-oscuridad.

1.1.2. Análisis bioquímico del cerebro

Analizamos los niveles de receptores de corticoides así como de NCAM y de PSA-NCAM en el hipocampo y en la corteza de estos animales debido a la implicación de dichas áreas en la regulación de los procesos de ansiedad y memoria (Gray, 1983; Lacroix y cols, 2000; McNaughton y Gray, 2000; Vinogradova, 2001).

Las ratas menos ansiosas expresaron más cantidad de receptores de tipo GR en el hipocampo.

Tanto los GRs como los MRs cerebrales son los responsables de la acción de los glucocorticoides sobre el cerebro y se encuentran mediando un amplio abanico de respuestas emocionales (Gray, 1983).

Hallamos que los animales LA expresaban más receptores tipo II o GRs que los HA en el hipocampo lo que difiere de lo encontrado en ratones de la cepa C57BL/6 en los que se vio que un rasgo de ansiedad elevado se correspondía con elevados niveles de ARNm para el receptor de glucocorticoides en el hipocampo (Jakovcevski y cols, 2007). Tampoco se encontraron diferencias al dividir la población únicamente en HA y LA en cuanto a los niveles de GRs hipocampales. La diferencia con nuestros resultados podría deberse, en el primer caso a las distintas especies usadas para cada estudio, y en el segundo caso a la división de la población en 2 o 3 grupos de ansiedad.

Dividiendo la población en dos grupos de ansiedad habíamos comprobado que las ratas menos ansiosas expresaban mayores niveles MRs en el hipocampo (Herrero y cols, 2006). Sin embargo en este estudio no entramos diferencias al analizar la expresión de dichos receptores ni en la corteza frontal ni en el hipocampo. Existen diversos estudios en donde se han relacionado niveles elevados de MRs con niveles bajos de ansiedad (Casolini y cols, 1997; Catalani y cols, 2000), así como con un mejor índice de memoria de reconocimiento (Lai y cols, 2007), y viceversa (Vallée y cols, 1997; Weinstock, 2001). Para estudiar la función de los receptores de tipo MR en la regulación del eje HHA y en el control de la ansiedad se generó un ratón transgénico el cual sobreexpresa dichos receptores en todo el cerebro. El aumento de la densidad de MRs indujo un déficit en la expresión de GRs hipocampales y un incremento en la del receptor de serotonina tipo 5HT-1A. Los autores plantean que los MRs actuarían junto con los GR y en la misma dirección en cuanto a la modulación del eje HHA. Sin embargo, sus acciones serían contrarias en cuanto a la regulación de las respuestas de ansiedad (Rozeboom y cols, 2007). También se ha comprobado utilizando tres modelos diferentes de evaluación de la ansiedad que el bloqueo selectivo de los receptores hipocampales de tipo MR mediante un

antagonista tiene efectos ansiolíticos dosis-dendientes (Bitran y cols, 1998).

Relación entre NCAM y PSA-NCAM y el rasgo de ansiedad

Al analizar los niveles de NCAM en los tres grupos de ansiedad no se encontraron diferencias significativas en el hipocampo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo al dividir la población en HA y LA.

En la corteza prefrontal se observó que los animales LA expresaron niveles mayores de NCAM que los HA. A este respecto, se ha descrito la relación entre niveles elevados de ansiedad y baja expresión de NCAM en ratones mutantes carentes de NCAM, los cuales muestran un estado de ansiedad superior al de los ratones control (Cremer y cols, 1994; Stork y cols, 1999) hecho que se revierte cuando dichos ratones mutantes sobreexpresan la isoforma NCAM-180 (Stork y cols, 2000b). Estos resultados parecen apuntar hacia una posible implicación específica de cada una de las isoformas de NCAM en diferentes procesos neurales. De hecho se ha observado que ratones transgénicos que secretan más NCAM soluble que la cepa salvaje no ven alterada su ansiedad (Pillai-Nair y cols, 2005).

No obtuvimos diferencias en los niveles de PSA-CAM en ninguna de las áreas estudiadas. Hoy en día no se dispone de muchos datos acerca de la relación entre la expresión de PSA-NCAM y el rasgo de ansiedad. Cabe resaltar un estudio realizado con ratones mutantes carentes de PSA-NCAM, en el que se ha observado un incremento en la ansiedad de los animales evaluados en el LCE (Markram y cols, 2007a). En la misma línea de resultados, un estudio en el que se administró postnatalmente a ratas metilfenidato (un fármaco utilizado en el tratamiento pediátrico del síndrome de déficit de atención e hiperactividad) demostró que las ratas tratadas con el fármaco presentaban una conducta menos ansiosa y un incremento importante en el número de células que expresaban PSA-NCAM en el giro dentado del hipocampo (Gray y cols, 2007).

1.1.3. Evaluación cognitiva

Un rasgo de ansiedad bajo favoreció la memoria espacial el segundo día de entrenamiento

La siguiente prueba que realizamos fue el laberinto acuático de Morris que, como ya se ha mencionado, posiblemente sea la prueba de aprendizaje espacial más utilizada en roedores de laboratorio. En el presente estudio no encontramos que la ansiedad intrínseca de los animales afectara al aprendizaje en el LAM. Sólomente en el primer ensayo del segundo día, los sujetos LA recorrieron significativamente menos distancia para alcanzar la plataforma escondida que los otros dos grupos, lo cual puede considerarse una diferencia en la memoria a largo plazo, puesto que habían pasado 24 horas después del primer día de entrenamiento. Estos resultados son similares a los obtenidos recientemente en nuestro laboratorio dividiendo la población en HA y LA. Tras realizar una única sesión de entrenamiento de 8 ensayos consecutivos, los animales HA mostraron una peor curva de aprendizaje espacial y una deficiencia de memoria al cabo de 24 horas (Herrero y cols, 2006), al igual que hemos encontrado en el primer ensayo del segundo día en el presente estudio. Otros trabajos también han comprobado que animales con niveles elevados de ansiedad presentan alteraciones en la ejecución de tareas de aprendizaje espacial (Lemaire y cols, 2000; Nishio y cols, 2001) mientras que ratas que muestran bajos niveles de ansiedad (debido a haber recibido corticosterona en la leche materna) están mejor capacitadas para su realización (Catalani y cols, 2002).

Por otro lado, no obtuvimos diferencias en ninguno de los parámetros analizados de la prueba de memoria espacial llevada a cabo al día siguiente de la conclusión del entrenamiento. No obstante, cabe indicar que los animales LA fueron los únicos que nadaron en el cuadrante diana un tiempo significativamente mayor que la búsqueda al azar en cualquiera de los cuadrantes (25%), mientras que tanto los animales HA como los IA nadaron al azar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio al dividir a los animales en HA y LA y utilizar un protocolo similar al llevado a cabo en este trabajo (Herrero y cols, 2006). Se ha demostrado que los individuos más ansiosos pueden presentar problemas de atención a la hora de realizar diversas tareas de

aprendizaje debido que tienden a focalizar dicha atención en la búsqueda de posibles amenazas en el entorno, afectando a su capacidad de adquirir y procesar la información relevante para la ejecución de la prueba (Shapiro y Lim, 1989; Mathews, 1990). Esto podría explicar por qué en esta prueba de memoria espacial con un alto componente de estrés intrínseco, las ratas más ansiosas tuvieron mayores dificultades para recordar la localización de la plataforma escondida en el primer ensayo del segundo día de entrenamiento. Sin embargo, tras el segundo día de entrenamiento todos los animales habían aprendido.

Por otro lado, sabíamos por experimentos previos que los niveles de corticosterona tras la prueba de memoria del LAM eran mayores en las ratas HA, coincidiendo con otros estudios que apuntan hacia una relación inversa entre la ejecución de una tarea espacial y los niveles de corticosterona en plasma (Beiko y cols, 2004; Venero y cols, 2004; Herrero y cols, 2006). Una posible explicación del efecto nocivo de los glucocorticoides en la ejecución de tareas espaciales vendría dada por la interferencia de los mismos en la formación de la LTP en el hipocampo, y por tanto con los procesos relacionados con aprendizaje y memoria espacial (Maren y Baudry, 1995).

Recientemente se ha planteado la hipótesis de que aunque la activación continua y predominante de receptores de mineralocorticoides parece estar relacionada con niveles bajos de ansiedad y elevada motivación, no favorece el aprendizaje ni la memoria (Brinks y cols, 2007b). Cuando dicha activación continua se acompaña de la activación moderada de GRs, no sólo se mantienen niveles bajos de ansiedad y alta motivación, sino que además se favorecen los procesos cognitivos, expresados como un descenso en el número de errores en pruebas que evalúan la memoria de trabajo. Y por último, cuando la activación de los GR es elevada, no sólo se produce un deterioro en el aprendizaje, sino que también se traduce en niveles elevados de ansiedad. Como hemos visto, los animales clasificados como LA tienen mayores niveles de glucocorticoides circulantes en condiciones basales, lo que podría estar favoreciendo su baja ansiedad y su mejor ejecución de esta prueba espacial. A esto habría que añadir el hecho de que, como hemos comprobado, las ratas menos ansiosas presentan un sistema de retroalimentación

negativa del eje más eficaz que las ratas HA, tal vez favorecido por su mayor expresión de GRs hipocampales. Si el estrés asociado al aprendizaje en el laberinto acuático de Morris induce una mayor liberación de glucocorticoides en los animales HA, como se ha visto previamente en nuestro laboratorio, se podría hipotetizar que en este subgrupo de ratas la alteración en el control de la respuesta de estrés en el eje HHA provocaría que los receptores de tipo GR se sobreactivaran más tiempo, lo cual podría resultar en un déficit de aprendizaje espacial. A este respecto cabe indicar que el bloqueo continuado de los receptores de tipo GR mediante un antagonista administrado i.c.v. no sólo disminuye el número de receptores MR en el hipocampo, sino que mejora la función cognitiva de los animales evaluados en el LAM, mientras que la administración del antagonista durante tres días produce un déficit cognitivo (Oitzl y cols, 1998). Sería interesante estudiar en qué punto del sistema de control negativo de la respuesta de estrés se encuentra la alteración que impide a los animales más ansiosos atenuar de forma eficaz la liberación de glucocorticoides, puesto que al parecer la activación elevada de sus receptores hipocampales de tipo GR ante una situación adversa, no sólo no es eficaz en la retroalimentación negativa de la actividad del eje HHA de los sujetos, sino que podría participar en la alteración de sus capacidades cognitivas.

La memoria de reconocimiento de objetos no se vio alterada por el rasgo de ansiedad de los animales

En esta prueba no vimos diferencias en el índice de memoria o discriminación entre HA, IA y LA. Es posible que el protocolo que hemos utilizado en este experimento sea lo suficientemente sencillo como para que todas las ratas fueran capaces de aprender y no mostraran diferencias en sus índices de discriminación. Otra posible interpretación es que el esfuerzo por disminuir el componente de estrés de la prueba mediante la habituación al contexto haya hecho que el rasgo de ansiedad no haya sido un factor determinante en la realización de la misma. O simplemente puede ser que los animales HA, LA e IA no difieran en este tipo de memoria de reconocimiento. En concordancia con estos resultados, tampoco se vieron diferencias entre ratas HE (del inglés *high exploratory*, alta exploración) y LE (del inglés *low exploratory*, baja exploración) clasificadas en función de

los datos obtenidos en una prueba de exploración de un ambiente novedoso (Mallo y cols, 2007). En este modelo, son las ratas HE las que mostraron tener un comportamiento menos ansioso en el LCE y por tanto las más similares a nuestras LA. Tampoco difieren en la memoria de reconocimiento de objetos ratas de la cepa Wistar y de la cepa Lewis, las cuales *a priori* difieren en su ansiedad, siendo más ansiosas las primeras (Ennaceur y cols, 2005). En la misma línea de resultados, los ratones KO para el receptor de serotonina de tipo 1A, que presentan niveles de ansiedad más altos que la cepa silvestre y se consideran incluso un modelo de ansiedad humana (Parks y cols, 1998; Ramboz y cols, 1998; Heisler y cols, 1998; Sibille y cols, 2000; Klemenhagen y cols, 2006), mostraron un índice similar de memoria en la PRO al habituar a los animales al contexto (Klemenhagen y cols, 2006). Hay que tener en cuenta que en nuestro protocolo habituamos a los animales a la arena durante los 5 días previos al entrenamiento, precisamente para evitar que la neofobia interfiriera en la tendencia de los sujetos a explorar los objetos, y por tanto que las posibles diferencias encontradas entre los grupos se debieran únicamente a diferentes circuitos neuronales asociados al rasgo de ansiedad.

Una forma de estudiar el efecto de la ansiedad en el aprendizaje es mediante lesiones en áreas cerebrales específicas implicadas en su modulación como la amígdala (Adamec y Young, 2000; Kalynchuk, 2000) o la corteza perirrinal (Hannesson y cols, 2005). Al lesionar la corteza perirrinal, no sólo se incrementa la ansiedad, sino que además la capacidad de aprendizaje y memoria en la PRO se ve alterada. Sin embargo, en este caso, los autores no consideraron que el déficit cognitivo encontrado se debiera al aumento de la ansiedad puesto que tanto los animales lesionados como los controles exploraron el mismo tiempo total los objetos. Es decir, el no observar la neofobia que cabría esperar de los animales más ansiosos fue interpretado por los autores como que la ansiedad no había sido un factor determinante en el establecimiento de la memoria de reconocimiento de objetos.

El rasgo de ansiedad no afectó a la memoria emocional evaluada en el condicionamiento del miedo al contexto

Como ya ocurrió con los experimentos realizados dividiendo la población en dos

grupos de ansiedad, no encontramos diferencias entre HA, IA y LA en el condicionamiento del miedo al contexto. Algunos autores han propuesto la existencia de una disociación entre la ansiedad y el condicionamiento, ya que, por ejemplo, en ratones se ha visto que la administración de urocortina II, un agonista del receptor de tipo II para el CRF, aumenta el tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos del LCE, pero no afecta a la memoria en el condicionamiento al contexto ni al tono (Todorovic y cols, 2007). Sin embargo, existe un estudio en donde sí se ha encontrado un efecto de la ansiedad en el condicionamiento al contexto clasificando a las ratas en función de su capacidad exploratoria en HE (del inglés *high exploratory activity*, menos ansiosas en el LCE) y LE (del inglés, *low exploratory activity*, más ansiosas), observando que las ratas HE permanecían más tiempo inmóviles en la prueba de memoria al contexto que las LE (Mallo y cols, 2007). Es importante tener en cuenta que en dicho estudio los animales fueron condicionados utilizando una intensidad de corriente de 1,5 mA, lo que se considera una intensidad alta en contraposición con la utilizada en nuestro trabajo que fue de 0,4 mA y se corresponde con una intensidad moderada. De hecho se sabe que a partir de 1 mA no sólo se induce una memoria más intensa y duradera en el tiempo (Cordero y cols, 1998), sino que implica un proceso de consolidación distinto y que puede asimilarse a lo que se define como 'memorias traumáticas' (Cordero y cols, 2002). Otras líneas de investigación también apoyan el hecho de que las diferencias innatas en los niveles de ansiedad de varias cepas de ratones predisponen la fuerza con la que se establece la memoria emocional en un paradigma de condicionamiento del miedo (Avgustinovich y cols, 2000; Balogh y Wehner, 2003). Un estudio recientemente publicado que los ratones C57BL/6J y BALB/c difieren en su memoria emocional al del condicionamiento al contexto pero no al tono. A pesar de no presentar diferencias en sus niveles de corticosterona basales, los ratones de la cepa BALB/c, los más ansiosos, mostraron una mayor liberación de corticosterona 30 y 60 minutos tras el comienzo del protocolo de condicionamiento y permanecieron más tiempo inmóviles durante la prueba de memoria en comparación con los ratones C57BL/6J, menos ansiosos (Brinks y cols, 2007a). Este resultado difiere del aportado en este trabajo, puesto que ya que las diferencias en el condicionamiento en nuestro caso han sido en la

versión auditiva del paradigma. Es importante recordar que en ambos protocolos de condicionamiento – CMT y CMC - los circuitos neuronales así como las áreas implicadas no son las mismas. Esto unido a que se trata de especies distintas podría explicar la divergencia en los resultados encontrados. Aún así, en ambos estudios hayamos evidencias de cómo el rasgo de ansiedad influye en la fuerza con la que almacenan diversos tipos de memoria. En un estudio de Pugh y colaboradores (Pugh y cols, 1997) se demostró un efecto diferencial de los glucocorticoides en el condicionamiento del miedo al tono y al contexto, comprobando que la falta de respuesta de glucocorticoides en los animales adrenalectomizados parecía afectar únicamente al establecimiento del condicionamiento del miedo al contexto, posiblemente debido a la acción de los corticoides sobre el hipocampo, una estructura implicada en el CMC pero no en el CMT (Selden y cols, 1991; Kim y Fanselow, 1992; Phillips y LeDoux, 1992).

Cuando tratamos de extinguir la memoria emocional del miedo reexponiendo a los animales al contexto donde habían sido condicionados, tampoco encontramos diferencias entre los tres subgrupos de ansiedad, únicamente una tendencia a que las ratas HA extinguieran mejor en la tercera sesión de extinción. La relación entre la ansiedad y la extinción de la conducta de miedo se ha descrito recientemente utilizando el paradigma de condicionamiento de miedo al tono. Wellman y colaboradores (Wellman y cols, 2007) han comprobado que ratones KO para el transportador de serotonina, que muestran una conducta más ansiosa que la cepa salvaje, presentan dificultades a la hora de extinguir el miedo condicionado a un tono lo cual está acompañado por alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas a nivel amigdalino y de la CPF medial, lo que podría estar comprometiendo el correcto funcionamiento del circuito cortico-límbico.

Altos niveles de ansiedad dificultan el condicionamiento del miedo al tono

Anteriormente en el laboratorio, se había encontrado que las ratas HA condicionaban menos en el paradigma de CMT que las LA al dividir la población en dos. Hemos corroborado que, efectivamente, ocurre lo mismo dividiendo la población en tres grupos en función de su ansiedad en el LCE, y nos decidimos abordar el estudio de dichas

diferencias desde distintas perspectivas. Nos planteamos que el déficit en la memoria emocional encontrada en los animales más ansiosos podía ser debida a una alteración en el procesamiento de los estímulos y/o en los mecanismos de atención selectiva. Dicha hipótesis concuerda con estudios en humanos en los que se ha visto que el rasgo de ansiedad puede interferir con el CMT (Chan y Lovibond, 1996; de Quervain y cols, 2003a) debido a las respuestas de anticipación basadas en la expectación a la llegada de eventos aversivos (Borkovec y Roemer, 1995) o bien debido a un déficit atencional durante la adquisición de las claves contextuales, auditivas o visuales (Lubow y Gewirtz, 1995).

En primer lugar quisimos estudiar qué ocurría con la respuesta del eje HHA y del SNA tras el entrenamiento del CMT. Comprobamos que, aunque en todos los grupos se producía un incremento de los niveles de corticosterona en plasma debido al estrés que suponen las descargas, las ratas LA seguían presentando mayores niveles de corticoides que las HA inmediatamente después del entrenamiento. Los mayores niveles de corticosterona liberados durante la prueba podrían ser los responsables de que este grupo haya consolidado con más fuerza la relación entre el tono y la descarga. Se ha visto que la cantidad de corticosterona liberada está relacionada con el tiempo de inmovilización que se registra durante la prueba de memoria del CMT (Corodimas y cols, 1994). Ratas Wistar clasificadas en HRA y LRA (alta y baja actividad locomotora vertical, del inglés, *high* y *low rearing activity*) en el campo abierto y que además mostraron valores similares a nuestras HA y LA en el LCE, también manifestaron diferencias en la consolidación de la memoria. Así, las ratas HRA recordaban peor al ser evaluadas en condiciones amenazantes (Borta y Schwarting, 2005). La curva de recuperación de los niveles basales de corticosterona que realizamos tras el entrenamiento, reflejó que aunque las ratas LA tienen niveles basales y post-entrenamiento mayores, su sistema de retroalimentación es más eficaz que el de los otros dos grupos. De hecho, a los 30 minutos del entrenamiento sólo los niveles de corticosterona de las ratas LA habían disminuido significativamente.

El grado de activación del SNA puede relacionarse con los niveles de glucosa sangre (Umhau y cols, 2003). Es más, dichos niveles correlacionan con la intensidad del estresor tanto en ratas (Armario y cols, 1990) como en humanos (Armario y cols, 1996).

Sin embargo, aunque en nuestro caso no hemos encontrado diferencias significativa en el grado de activación noradrenérgica inmediatamente después del entrenamiento del CMT, los animales HA mostraron niveles más altos de glucosa 30 minutos después del mismo en comparación con los IA y los LA. A pesar de que se ha propuesto que la activación simpática y la consiguiente hiperglucemia facilitan la memoria emocional inducida por las descargas (Hall, 1986), al aportar al organismo la energía necesaria tanto para la respuesta fisiológica como para los cambios neurales relacionados con los procesos de plasticidad (McGaugh, 1989) y el establecimiento del aprendizaje emocional (Ghizoni y cols, 2006), en nuestro estudio la liberación incrementada de glucosa en los animales más ansiosos no ha sido suficiente para que se estableciera la memoria emocional con la misma fuerza que en los animales LA.

A partir de este resultado, quisimos comprobar si modulando farmacológicamente la ansiedad de las ratas HA con un ansiolítico, conseguíamos que condicionaran de la misma forma que las ratas menos ansiosas. Para ello, administramos buspirona 1 hora antes del entrenamiento. La dosis de buspirona, como ya se ha mencionado, se eligió a partir del estudio de Griebel y colaboradores (1997) en el que demostraban que dicha dosis (0,1 mg/kg) incrementaba el tiempo que los animales permanecían en los brazos abiertos del LCE incluso más que otras dosis más altas, y además no afectaba a la actividad locomotora. Es más, se ha reportado que dosis inferiores a 1 mg/kg no producen preferencia de lugar en ratas, en contraste con dosis mayores que se ha visto tienen potencial de recompensa (Matsuzawa y cols, 2000). Para evaluar dicha dosis en nuestras condiciones, ratas clasificadas previamente como HA, IA y LA en el LCE fueron tratadas con buspirona o vehículo una hora antes de someterlas a la caja luz-oscuridad, utilizando también un grupo de animales intactos. Dentro del grupo de animales intactos, se mantuvo el rasgo de ansiedad por el que se habían clasificado las ratas en el LCE, confirmando que las medidas de ansiedad son consistentes entre ambas pruebas. Al analizar el tiempo que los sujetos permanecieron en el compartimento iluminado, comprobamos que la buspirona parecía modular la ansiedad de los animales HA sin afectar a la de los otros dos grupos, por lo que pensamos que se trataba de la dosis apropiada para modular la adquisición en

el paradigma de CMT. El hecho de que un ansiolítico tenga un mayor efecto en un grupo de individuos con un rasgo de ansiedad elevado ya se había comprobado en estudios con ratas seleccionadas. Así, aunque el tratamiento con diazepam (un ansiolítico de la familia de las benzodiazepinas) afectó a todos los animales, las ratas más ansiosas fueron más sensibles al efecto ansiolítico evaluado en el LCE (Liebsch y cols, 1998);(Commissaris y cols, 1990;Ramos y cols, 1997).

Así pues, una vez seleccionada la dosis de buspirona, decidimos estudiar el efecto de este ansiolítico en el CMT administrándolo una hora antes del entrenamiento. Cuando evaluamos la memoria emocional 48 horas después, vimos que la buspirona incrementaba el porcentaje de tiempo de inmovilización en todos los grupos a pesar de no haber afectado a la ansiedad de los animales IA y LA en la CLO. Puesto que otra de las suposiciones que planteamos era que la ansiedad de los animales podía estar interfiriendo en la atención que los sujetos prestan al tono durante el entrenamiento, es posible que la administración del ansiolítico no haya alterado la ansiedad innata de los individuos menos ansiosos como para modificar su conducta con respecto a los tratados con salino o a los intactos, pero si haya sido suficiente como para incrementar su atención y favorecer el establecimiento de la conexión entre el estímulo condicionado y el incondicionado. Por otro lado, encontramos un efecto llamativo del vehículo solamente en el grupo HA, favoreciendo el condicionamiento de los animales. Para intentar interpretar el por qué de este efecto, medimos los niveles de corticosterona y glucosa una hora después de haber administrado suero salino a un grupo de animales clasificados por su ansiedad. Los niveles de corticosterona inducida por la inyección no difirieron entre los grupos, produciéndose un decremento general de la liberación de glucocorticoides. Sin embargo, en los animales HA la inyección de salino indujo una activación mayor del SNA con respecto a los otros grupos, manifestándose en un incremento global de la glucosa. Este resultado corrobora lo que ya se había visto en ratas de la cepa Sprague-Dawley, en las que la inyección de salino así como la manipulación de los animales indujeron sendos incrementos en la glucosa plasmática (Hall y Gold, 1986). Como ya se ha mencionado, la glucosa puede modular el aprendizaje actuando directamente en el cerebro tras atravesar

la BHE o bien activando las aferencias vagales (Messier, 2004). El SNA cerebral juega un papel importante promoviendo la activación comportamental así como procesos cognitivos que incluyen el estado de alerta, la atención, el aprendizaje y la memoria ((Devauges y Sara, 1990; Aston-Jones y cols, 1991; Cole y Robbins, 1992; Berridge y cols, 1993); para revisión ver (Robbins y Roberts, 2007). También se ha encontrado una correlación positiva entre la ansiedad de los animales, su comportamiento en el LCE y la hiperglucemia. Así, ratas con un comportamiento más ansioso en el LCE mostraron también mayores niveles de glucosa en sangre (Ghizoni y cols, 2006). En otro estudio realizado con humanos, se encontró un incremento del 6% de glucosa en sangre asociado con el impacto de imágenes con un contenido emocional elevado y la mejora de la retención del contenido de dichas imágenes en la fase de prueba de memoria (Blake y cols, 2001). Más concretamente, el SNA está relacionado con procesos de atención selectiva como la modulación de la respuesta a claves explícitas durante el CMT y el aprendizaje de las respuestas emocionales. Se ha visto que la eliminación cortical de noradrenalina altera el CMT pero no el CMC (Selden y cols, 1991) y que la interacción entre el SNA en la amígdala y los glucocorticoides está relacionada con el establecimiento de las memorias emocionales (Roozendaal y cols, 2006). Por tanto, es plausible pensar que la activación del SNA y la consiguiente liberación de glucosa al torrente circulatorio inducido por la inyección favoreció que las ratas HA llegaran al momento en el que se establece el condicionamiento con unas condiciones óptimas para el establecimiento de dicha memoria emocional, a pesar de que sus niveles de corticosterona no han llegado a ser tan altos como los de los LA. En un estudio reciente se demostró que los niveles de NA en la amígdala correlacionaban con los índices de memoria registrados 24 horas después del entrenamiento, lo que podría indicar que el nivel de actividad del SNA predice la fuerza del establecimiento de la memoria emocional (McIntyre y cols, 2002). En la misma línea se ha encontrado que un incremento en la liberación de NA en la corteza prefrontal medial mejora la realización de pruebas atencionales en ratas. Sin embargo, otro estudio llevado a cabo con ratones en los que el gen de la encima dopamina β -hidroxilasa no era funcional y por tanto carentes de adrenalina y noradrenalina, no mostraron ninguna alteración en su

atención utilizando el paradigma de condicionamiento de miedo (Murchison y cols, 2004).

Es posible que niveles elevados de ansiedad alteren la memoria en el CMT interfiriendo en la capacidad para prestar atención al tono. La inhibición latente es una reducción en la respuesta a un estímulo como consecuencia a una exposición previa no reforzada y ha sido utilizada tanto en humanos (Lubow y Gewirtz, 1995) como en roedores (Feldon y Weiner, 1992) para estudiar la capacidad de ignorar estímulos irrelevantes y procesar nuevos estímulos sensoriales o cognitivos. Los resultados encontrados concuerdan con nuestra hipótesis, mostrando que los animales LA intactos mostraron tener IL mientras que las ratas HA pre-expuestas (PE) no, ya que permanecieron inmóviles la misma cantidad de tiempo que las que no fueron pre-expuestas (N-PE). La alteración de la IL indica que un estímulo familiar es procesado como si fuera novedoso (Shalev y cols, 1998), y de ahí la ausencia de diferencias entre las ratas HA PE y las HA N-PE. La administración de buspirona una hora antes de la pre-exposición favoreció la aparición de IL en las ratas HA intactas, sin afectar a la IL en las ratas LA. Por tanto, nuestros datos sugieren que la elevada ansiedad estaría interfiriendo con el procesamiento de estímulos neutros y por tanto con una utilización eficaz de los recursos atencionales y de aprendizaje, lo que aporta una nueva evidencia sobre la influencia del rasgo de ansiedad en el CMT en ratas. A pesar de que estudios previos han mostrado que la administración tanto aguda como crónica de corticosterona influye en la IL (Shalev y cols, 1998), estos datos no se ajustan a nuestros resultados puesto que nuestras ratas más ansiosas son las que presentan menores niveles de glucocorticoides. Se ha propuesto que los glucocorticoides reducen la capacidad del hipocampo para discriminar lo que es relevante de lo que es irrelevante en el entorno (Wolkowitz y cols, 1986; Lupien y McEwen, 1997). Pero tal y como venimos demostrando, los glucocorticoides no parecen ser los únicos responsables de las diferencias comportamentales relacionadas con un rasgo de ansiedad. Por un lado, parece ser que en pruebas que implican cierta dificultad, las hormonas de estrés podrían interactuar con el efecto de la glucosa en la memoria, facilitando o impidiendo la consolidación de la misma e incrementando la variabilidad con la que los sujetos reaccionan a los estímulos estresantes (Messier, 2004).

Como última aproximación al estudio de cómo la respuesta del eje HHA influye en el establecimiento de las memorias emocionales estudiamos el efecto de la adrenalectomía sobre el CMT y la ansiedad en la caja luz-oscuridad para los HA, IA y LA. Pudimos comprobar cómo, al evaluar las ratas en la CLO, los animales adrenalectomizados se comportaron como los HA *sham*, corroborando el hecho de que bajos niveles de corticosterona se relacionan con una conducta de tipo ansiogénico. Además, los animales *sham* mantuvieron su rasgo de ansiedad intacto, mostrando las LA una conducta menos ansiosa que las HA.

La prueba de memoria asociada al condicionamiento al tono que realizamos 48 horas tras el entrenamiento no reveló ningún efecto de la adrenalectomía, manteniéndose la tendencia a que los animales menos ansiosos recordaran mejor la asociación con el tono que los otros grupos. Este resultado está en consonancia con el obtenido anteriormente por Pugh y colaboradores (Pugh y cols, 1997), los cuales no encontraron que la eliminación de la respuesta de glucocorticoides afectara al condicionamiento del miedo al tono evaluado 24 horas después del entrenamiento. Se pone en evidencia un papel selectivo de los glucocorticoides con respecto a su participación en distintos procesos de aprendizaje y memoria. En un estudio realizado en 1984, Sakaguchi y colaboradores (Sakaguchi y cols, 1984) observaron en dos cepas de ratas - Wistar y SHR - que mientras que la adrenalectomía favorecía el establecimiento de la memoria emocional usando un protocolo de CMT, la administración de dexametasona era capaz de revertir los efectos de la operación en ambas cepas. Sin embargo, es necesario resaltar que la diferencia en el rasgo de ansiedad intrínseca de ambas cepas no está claro. De hecho, estudios recientes o bien no consideran que existan diferencias en el comportamiento relacionado con la ansiedad entre sujetos Wistar y SHR (Ferguson y Cada, 2004) o bien apuntan a que las ratas Wistar son más ansiosas que las SHR (Pandolfo y cols, 2007)).

Cuando reevaluamos la memoria emocional de estas ratas una semana después encontramos que todas las ratas adrenalectomizadas con reemplazamiento de corticosterona se comportaban como ratas HA *sham*, es decir, las ratas habían extinguido

la respuesta de miedo. Por otro lado, niveles elevados de corticosterona, como los que presentan las ratas LA *sham*, estarían dificultando dicha extinción. Se ha comprobado que la administración de corticosterona durante el entrenamiento del CMT favorece la consolidación de la memoria aversiva al tono (Hui y cols, 2004). En la misma dirección apunta el hecho de que las ratas más ansiosas extinguieran más fácilmente la conducta de miedo que las LA en el CMC.

1.2.- Efecto del rasgo de ansiedad en la vulnerabilidad al estrés y al déficit cognitivo asociado al envejecimiento

Un gran número de individuos se enfrentan cada día a elevados niveles de estrés en sus vidas, ya sea en el trabajo, en un entorno académico o a nivel personal lo cual conlleva un importante riesgo de llegar a padecer enfermedades (Dusselier y cols, 2005). La utilización de un protocolo de estrés crónico e impredecible con roedores da lugar a un perfil comportamental hasta cierto punto comparable al de las psicopatologías humanas asociadas a la ansiedad y/o la depresión (Willner, 1984; D'Aquila y cols, 1994; Zurita y cols, 2000; Buwalda y cols, 2005). En la rata, la corticosterona regula el metabolismo, las funciones fisiológicas, la expresión génica y la morfología neuronal del hipocampo (McEwen y Magarinos, 1997), por lo que funciones hipocampales como el aprendizaje y la memoria parecen ser susceptibles de ser alteradas por el ECI (Sapolsky, 1985; Kim y Yoon, 1998; de Kloet y cols, 1999).

Son numerosos los estudios en los que se indica que el envejecimiento está asociado con la desregulación del eje HHA y la disminución en la eficacia a la hora de finalizar la respuesta al estrés, lo que favorece, a su vez, el desarrollo del daño neural (Hauger y cols, 1994; Kawano y cols, 1994; Wei y cols, 2007). Basándonos en estos datos, la última aproximación experimental de esta segunda parte del trabajo consistió en investigar si el rasgo de ansiedad de los animales hace que unos u otros sean más vulnerables al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento tanto a nivel conductual como bioquímico.

En el presente estudio, el estrés crónico produjo una reducción significativa en la

ganancia de peso de los animales, lo cual es un indicador de la efectividad del protocolo (Sandi y Touyarot, 2006). En los animales que se dejaron envejecer, las curvas de crecimiento llegaron a igualarse 3 semanas después de la finalización del ECI, manteniéndose iguales hasta el final del estudio. Estos datos concuerdan con resultados previos en los que se ha comprobado que el protocolo de ECI produce una reducción del peso corporal a lo largo de la exposición al estrés, en contraposición con lo que ocurre con el estrés crónico no variable en el que aparece una tendencia a recuperar peso por parte de las ratas estresadas hacia la mitad del protocolo (Marin y cols, 2007).

1.2.1. Efecto del estrés en el comportamiento

El ECI no afectó al aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris

Cuando evaluamos el efecto del estrés en el LAM no encontramos diferencias ni en el aprendizaje ni en la memoria evaluada 24 horas después. La bibliografía aporta datos contradictorios con respecto al efecto del estrés crónico en esta prueba espacial. Son varios los estudios han demostrado que este protocolo es capaz de alterar la estructura y/o la función del hipocampo y la subsiguiente realización de pruebas de aprendizaje espacial (McEwen y Magarinos, 1997; Sousa y cols, 2000). Sin embargo, otros autores no han encontrado dicho efecto deletéreo, por lo que se ha planteado que los efectos nocivos del estrés dependen del tipo de estrés aplicado, la cepa y el sexo del animal.. Gouirand y Matuszewich (Gouirand y Matuszewich, 2005) encontraron que las ratas sometidas a un protocolo de ECI durante 10 días consecutivos aprendían mejor la localización de la plataforma durante el entrenamiento. Muchos autores consideran el ECI como un protocolo de estrés moderado en contraposición con protocolos de inmovilización más severos que se acompañan de niveles de glucocorticoides muy elevados, los cuales contribuyen a la atrofia hipocampal (Sousa y cols, 2000), reducción en la neurogénesis (Isgor y cols, 2004) y a la alteración tanto de la función cognitiva (Bodnoff y cols, 1995; Conrad y cols, 1996; McLay y cols, 1998; Touyarot y cols, 2004), como de la LTP (Pavlidis y cols, 1993; Bodnoff y cols, 1995). Sin embargo, otros estudios (Mabry y cols, 1996; Bartolomucci y cols, 2002), entre ellos experimentos previos de nuestro laboratorio, tampoco encontraron un deterioro del aprendizaje espacial utilizando un protocolo de estrés crónico

por inmovilización. Por tanto, aunque los cambios en el hipocampo inducidos por el estrés crónico en ocasiones pueden estar mediando diferencias en la conducta, esta relación entre la morfología y la función no siempre parece producirse (Gouirand y Matuszewich, 2005). La compleja interacción entre los niveles de glucocorticoides o los efectos del estrés y el aprendizaje suele explicarse gracias a la curva de corticoides en forma de U invertida (Lupien y McEwen, 1997) y en el caso del ECI probablemente nos encontraríamos en una zona media de liberación de corticosterona (Gouirand y Matuszewich, 2005).

Otra posible causa de no encontrar un efecto del estrés en esta prueba podría deberse a una mayor motivación por parte de las ratas estresadas. La motivación es un componente crítico en la realización de numerosas pruebas utilizadas para el estudio del aprendizaje y la memoria. Cuando los sujetos se encuentran ante una situación estresante continuada de la que no pueden escapar, se produce una conducta característica denominada 'indefensión aprendida' (Eisenstein y Carlson, 1997). En la prueba del LAM existe una vía de escape, la plataforma escondida, que motiva a los sujetos a realizar la tarea. Cuando los animales estresados y no estresados se enfrentan a un paradigma como el LAM, no parten del mismo grado de motivación (Bowman y cols, 2003). En un contexto nuevo la conducta se centra fundamentalmente en intentar escapar y explorar (Exner y Clark, 1993). En el caso particular del LAM, la correcta realización de la prueba depende de un delicado balance entre la motivación dada por la recompensa de salir y el estrés intrínseco al paradigma (Bardo y cols, 1996). Debido al protocolo de estrés crónico utilizado, las ratas fueron sometidas de forma aleatoria a diversas situaciones de estrés moderado en distintos contextos del cual no podían escapar. Ahora, todos los animales, tanto los estresados como los controles, se expusieron al agua y tuvieron que nadar para encontrar la plataforma, lo que podría considerarse un contexto estresante de por sí. La recompensa que supone el encontrar la plataforma podría motivar más a las ratas estresadas a aprender, mientras que el estrés intrínseco del LAM podría ser más nocivo para las ratas controles que habían permanecido en sus jaulas hogar durante los 28 días que duró el ECI. Misslin y colaboradores (Misslin y cols, 1982) comprobaron que la magnitud del incremento de los niveles de corticosterona era proporcional al grado en el

que un nuevo entorno difiere del entorno familiar. En este caso, aunque la situación y el contexto eran nuevos para los dos grupos, las ratas estresadas estaban habituadas a cambiar de entorno cada día, mientras que los animales controles era la primera vez que abandonaban la sala donde se encontraban estabulados.

El estrés crónico alteró la memoria de reconocimiento de objetos

En esta prueba, como ya se ha mencionado, se evalúa la conducta espontánea de los animales a explorar los nuevos objetos de su entorno (Ennaceur y Delacour, 1988). A la hora de estudiar un modelo hipocampal de memoria espacial es importante tener en cuenta el componente de estrés intrínseco de la prueba, ya que puede afectar a la motivación y al estado de alerta de los sujetos (de Quervain y cols, 1998). La utilización de la PRO y de la PLO nos permite reducir la acción de estas variables sobre el aprendizaje y la memoria (Ferguson y Sapolsky, 2007).

Evaluamos la memoria de reconocimiento de los animales a los 4 meses de edad (considerados jóvenes) y a los 11 meses de edad (considerados adultos). En ambos casos encontramos un efecto significativo del estrés, presentando las ratas estresadas índices de memoria más bajos que las ratas del grupo control, lo que podría apuntar a un posible daño neural causado por el estrés. Resultados similares han sido descritos por Barker y Kim (Baker y Kim, 2002) utilizando un protocolo de ECI, viendo además que las ratas estresadas presentaban alteraciones en la LTP hipocampal. En la misma línea de resultados se vio una disminución en el índice de discriminación en la PRO tras 21 días de estrés por inmovilización (Bowman y cols, 2003). Sin embargo, puesto que el estrés agudo también afecta a la memoria de reconocimiento de objetos en roedores (El Hage y cols, 2004; Kart-Teke y cols, 2006), no podemos discernir si el déficit de memoria encontrado a los 11 meses de edad se debe exclusivamente al efecto del ECI o a los recordatorios de estrés posteriores.

En monos se ha comprobado que en esta prueba están participando tanto la corteza parahipocampal como la rinal, teniendo incluso un papel mayor que el hipocampo (Zola-Morgan y cols, 1989; Squire y Zola-Morgan, 1991; Meunier y cols, 1993). En ratas, sin embargo, las lesiones en el hipocampo o en el fórnix han mostrado resultados

contradictorios en su efecto sobre la PRO (Wood y cols, 1993; Ennaceur y cols, 1997; Aggleton y cols, 1997; Bussey y cols, 2000; Mogensen y cols, 2004), por lo que en nuestro caso, no es fácil relacionar el efecto nocivo del ECI sobre la memoria con la alteración de un área cerebral específica.

La segunda vez que los animales se re-expusieron a la arena para realizar la prueba observamos un menor tiempo total de exploración de los objetos, así como un menor índice de memoria para ambos grupos. Esta observación también ha sido descrita en otros estudios (File y cols, 1993; Pereira y cols, 2005), y los autores sugieren que podría reflejar tanto una reacción de miedo aprendida ante las ya conocidas condiciones ansiogénicas del aparato (File y cols, 1993; Rodgers y Cole, 1993) como una habituación al mismo (Dai y cols, 1995; Thiel y cols, 1998) o una menor motivación por parte de los animales (Beck y Luine, 2002) con la consiguiente reducción de la actividad exploratoria.

El estrés crónico redujo la tasa de alternancia espontánea

Desde hace tiempo se sabe que tanto los roedores (Dember y Fowler, 1958) como gatos (Frederickson y Frederickson, 1979) y pollos (Brown, 1976) suelen alternar correctamente los brazos del laberinto utilizado para la PAE. Además, su tasa de alternancia está influenciada por la capacidad de memoria de trabajo de los animales (Isseroff, 1980; Lalonde y cols, 1986) y sus niveles de ansiedad (Mitchell y cols, 1985; Bats y cols, 2001).

Cuando evaluamos el efecto del estrés en las ratas una vez que estas tuvieron 20 meses de edad en la PRO, comprobamos que las ratas estresadas mostraron un índice de discriminación menor que aquellas que no habían sido estresadas en su juventud. Esto concuerda con datos obtenidos previamente en ratones, en los que se vio que tras 8 semanas de estrés crónico impredecible 'suave', los animales estresados veían disminuida su capacidad de alternancia, en este caso, en un laberinto en T (Pardon y cols, 2004). Es más, inyecciones de corticosterona administradas durante 8 semanas disminuyeron la tasa de alternancia espontánea en las ratas al compararse con aquellos sujetos que recibieron vehículo (Bardgett y cols, 1994). También se ha observado este efecto deletéreo tras dos semanas de estrés por inmovilización (Pierard y cols, 2006).

Existen numerosas áreas corticales implicadas en la realización correcta de esta prueba, entre ellas el hipocampo (Kirkby y cols, 1967;Johnson y cols, 1977;Sarnyai y cols, 2000) y la corteza prefrontal (Divac, 1975;Delatour y Gisquet-Verrier, 1996;Del Arco y cols, 2007). Podemos plantear que la alteración en la memoria de trabajo manifestada por las ratas estresadas esté relacionada con un posible daño neural producido durante el periodo de ECI y mantenido posteriormente por los recordatorios de estrés.

El estrés crónico afectó a la memoria de localización de objetos

Se sabe que un régimen de estrés continuado es capaz de alterar la memoria en la PLO (Beck y Luine, 1999;Beck y Luine, 2002;Bowman y cols, 2003) y nuestros resultados concuerdan con dichos datos. A pesar de que el índice de discriminación no fue muy alto en ninguno de los grupos, debido probablemente la edad avanzada de los animales (22 meses de edad), encontramos que los sujetos estresados manifestaron un déficit cognitivo importante con respecto a los animales controles. Se ha publicado que ratas con el hipocampo lesionado no realizan la PLO correctamente al compararlas con las ratas controles, lo que sugiere que el hipocampo juega un papel importante en el recuerdo de dónde y en qué contexto se encontraba un objeto (Mumby y cols, 2002). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que si se lesiona el giro dentado (GD) del hipocampo las ratas siguen siendo capaces de reconocer el cambio de posición del objeto conocido. Esto podría deberse también a que el tejido preservado en CA1 y CA3, que continúa recibiendo aferencias de la corteza entorrinal (Yeckel y Berger, 1990), estaría contribuyendo a la adquisición y retención de la memoria asociativa necesaria para llevar a cabo esta prueba correctamente (Hernandez-Rabaza y cols, 2007).

1.2.2. Efecto del estrés en los niveles plasmáticos de corticosterona

Las ratas estresadas liberaron más corticosterona que las ratas del grupo control durante y tras el protocolo de ECI

Está ampliamente comprobado que cuando los roedores son expuestos repetidamente a un estrés por inmovilización la liberación de corticosterona sufre una habituación, que normalmente se inicia a las dos semanas de haber comenzado el

protocolo (Burchfield y cols, 1980; Dal Zotto y cols, 2002; Gadek-Michalska y Bugajski, 2003). Sin embargo, la utilización de un protocolo de ECI induce una elevación continuada de los niveles de corticosterona (Burchfield y cols, 1980; Magariños y McEwen, 1995; Dal Zotto y cols, 2002) sugiriendo que la adaptación del eje HHA depende del tipo, la duración y la severidad del estresor escogido (Burchfield y cols, 1980; Pitman y cols, 1988; Magariños y McEwen, 1995; Blanchard y cols, 1998; Dal Zotto y cols, 2002).

Tres semanas después de haber comenzado el estrés, quisimos comprobar cómo estaba reaccionando el eje HHA de los animales estresados en relación con el grupo control midiendo la corticosterona plasmática de ambos grupos a tres tiempos, a tiempo 0 (en el grupo estrés representa el momento inmediatamente anterior a introducir las ratas en los cepos), 30 minutos después (justo antes de sacar a las ratas estresadas de los cepos) y una hora después. En las tres ocasiones, los niveles de corticosterona de las ratas estresadas fueron significativamente mayores que los de las ratas control, si bien en estas últimas se produjo un ligero incremento de la misma a los 30 minutos de la primera extracción debido, probablemente, al efecto estresante del corte en la cola. Estos resultados concuerdan con el estudio de Marin y colaboradores (Marin y cols, 2007) en el que observaron que tras 11 días de ECI, los niveles de corticosterona basales de las ratas Wistar adultas estresadas eran significativamente mayores que los de los animales del grupo control, obteniendo una curva de liberación de corticosterona en los animales estresados muy similar a la nuestra.

El análisis de los niveles plasmáticos de corticosterona al término del protocolo de ECI, a los 4 meses de edad, indicó que los animales estresados presentaban niveles basales de corticosterona mayores que los controles. Confirmamos de nuevo el hecho de que el ECI no produce tolerancia en la liberación de corticosterona (Rodríguez Echandia y cols, 1988) como ocurre con el estrés crónico por inmovilización (Keim y Sigg, 1976; Armario y cols, 2004). Este resultado coincide a su vez con lo visto en un experimento realizado con ratones sometidos a 7 semanas de ECI (Schmidt y cols, 2007).

El efecto del ECI sobre la liberación de corticosterona desapareció a los 24 meses de edad

A los 24 meses de edad, los animales viejos se sacrificaron, y encontramos que,

paradójicamente, los animales estresados presentaban menores niveles de corticosterona que los no estresados. Sandi y Touyarot (Sandi y Touyarot, 2006) utilizaron un protocolo de ECI similar al nuestro en ratas de 12 meses de edad a las cuales dejaron envejecer. A los 18 meses evaluaron los niveles de corticosterona en plasma y encontraron diferencias entre las ratas estresadas y las controles en la misma dirección que las halladas en nuestro estudio. Hay que tener en cuenta, que en el presente trabajo transcurrió más de un año entre la finalización del ECI y el sacrificio. En el estudio con ratones de Schmidt y colaboradores (Schmidt y cols, 2007) anteriormente mencionado, el incremento en los niveles de corticosterona encontrado inmediatamente tras la finalización del estrés desaparecía si se dejaba pasar una semana de intervalo entre la última prueba estresante y el sacrificio. Además se ha observado que la exposición a estímulos estresantes agudos de forma repetida (Pollard y cols, 1976) induce atenuación en la respuesta del eje de estrés. En nuestro protocolo de envejecimiento, las ratas se enfrentaron a situaciones estresantes una vez al mes desde los 3 meses hasta los 20 por lo que pudieron haber sufrido una habituación a las mismas. Podríamos hipotetizar que cuando las ratas estresadas se sacaron de sus jaulas para ser transportadas al quirófano donde fueron sacrificadas, podrían haber relacionado dicha situación con el mismo patrón utilizado cada mes para ser estresadas y mostrar así una respuesta atenuada en su eje HHA y por tanto en los niveles de corticosterona. Sin embargo, las ratas del grupo control no estaban acostumbradas a ser trasladadas a otra habitación que no fuera la de conducta y estar en contacto con otras personas que no fueran el investigador encargado de llevarla a cabo, lo que pudo desencadenar una reacción de miedo intensa que coincidiría con unos niveles elevados de corticosterona.

1.2.3. Efecto del estrés en los niveles bioquímicos de moléculas y receptores

El ECI no alteró la expresión de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo, pero sí en la corteza frontal.

En este trabajo, el estrés crónico e impredecible no causó ningún efecto en los niveles de receptores de glucocorticoides de tipo MR ni de tipo GR en el hipocampo, ni

inmediatamente después del estrés, ni a los 24 meses de edad.

Respecto a lo que ocurre en los animales jóvenes, en la literatura encontramos datos a favor y en contra de nuestros resultados. Tanto experimentos previos realizados en nuestro laboratorio como datos aportados por la bibliografía muestran una ausencia de efecto de distintos protocolos de estrés crónico sobre la expresión de ambos tipos de receptores en el hipocampo (Herman y Cullinan, 1997;Paskitti y cols, 2000). Parece ser que la regulación a la baja de la expresión de los GRs hipocampales se produce tras un estrés agudo o un estrés crónico breve, pero no cuando la situación estresante se prolonga en el tiempo o tras la administración de dosis elevadas de corticosterona (Paskitti y cols, 2000;Fujikawa y cols, 2000;Fernandes y cols, 2002). Sin embargo, otros autores han reportado una disminución significativa de los niveles de GRs hipocampales utilizando diversos paradigmas de estrés crónico y en distintas especies (Herman y cols, 1995;Makino y cols, 1995;Kitraki y cols, 1999;Chen y cols, 2007).

Tras analizar los homogenados de corteza frontal, los receptores de tipo GR aparecieron disminuidos en los animales viejos estresados. Estudios recientes apuntan que el estrés crónico por inmovilización disminuye la expresión de los receptores de tipo GR en la corteza prefrontal en relación con los animales no estresados (Mizoguchi y cols, 2003;Chen y cols, 2007), pero dichas diferencias desaparecen cuando se reduce el tiempo y la duración del estrés (Karandrea y cols, 2002). Así pues, nuestros resultados parecen indicar que ha sido necesaria la combinación del efecto deletéreo del estrés, los recordatorios y el proceso de envejecimiento lo que ha llevado a mermar la expresión de los receptores de glucocorticoides.

Los receptores tipo MR presentaron niveles más bajos en la corteza de los animales estresados jóvenes, perdiéndose dicha diferencia al llegar a la senectud. Datos previos sugieren que aunque los MR neuronales están regulados negativamente por los glucocorticoides vía GRs (Herman y cols, 1999), se requieren niveles muy elevados de glucocorticoides circulantes para regular a la baja los MR ya que puede producirse una habituación o modulación de los receptores tipo GR durante el estrés crónico (Paskitti y cols, 2000), situación que se produce durante un protocolo de ECI como el utilizado en el

presente trabajo. Mientras que algunos grupos han reportado que la expresión de receptores de tipo MR disminuye cuando los animales son sometidos a estrés crónico (Herman y cols, 1995; Touyarot y cols, 2004; Schmidt y cols, 2007), otro autores no encontraron dicho efecto (Paskitti y cols, 2000).

La diferencias entre los resultados aportados por los diferentes investigadores pueden deberse a la edad y cepa de roedor utilizado así como la duración, intensidad y tipo de estresor utilizada por cada experimentador.

Posible papel protector del FGF hipocampal en las ratas viejas estresadas

Se sabe que los glucocorticoides regulan a la alza la expresión tanto de la proteína (Chadi y cols, 1993; Mocchetti y cols, 1996; Hansson y cols, 2000) como del gen que codifica para el FGF (Mocchetti y cols, 1996; Hansson y cols, 2000) en todo el SNC, atribuyéndole un efecto neuroprotector. Es más, la reducción de los niveles basales de glucocorticoides mediante adrenalectomía atenúa la expresión del FGF (Follesa y Mocchetti, 1993; Chao y McEwen, 1994). A pesar de ello, en este estudio observamos que el ECI no afectó a los niveles de FGF medidos en el hipocampo inmediatamente después del estrés crónico. La literatura nos ofrece resultados diferentes en función del tipo de estresor empleado. En concordancia con nuestros datos, Kuroda y McEwen (Kuroda y McEwen, 1998) vieron que el estrés crónico por inmovilización no alteraba los niveles de FGF hipocampal. Sin embargo, otro estudio reveló que tras 28 días recibiendo una descarga en las patas, la expresión de FGF se encontraban disminuidos en el hipocampo (Bland y cols, 2007).

A pesar de no haber visto un efecto sobre la expresión de FGF inmediatamente después del ECI, las ratas viejas estresadas expresaban significativamente más FGF en el hipocampo que las controles. Los recordatorios de estrés a los que fueron sometidas podrían haber facilitado un incremento progresivo de los niveles de FGF en el hipocampo para compensar el posible daño neural producido por los recordatorios. A este respecto, se ha comprobado que el estrés agudo induce una modulación a la alta del FGF en el cerebro que podría actuar como un mecanismo de compensatorio para mantener la homeostasis celular y reducir el daño neuronal (Molteni y cols, 2001).

En la corteza frontal no se han encontrado diferencias en los niveles de FGF entre animales estresados y controles ni inmediatamente después del estrés ni a los 24 meses de edad. Aunque se sabe que la adrenalectomía disminuye significativamente los niveles de FGF en la corteza frontal (Riva y cols, 1995) y que la administración exógena de glucocorticoides (Riva y cols, 1998) así como el estrés agudo (Molteni y cols, 2001) la incrementa, no hay evidencias en la literatura del efecto del estrés crónico en animales adultos. Únicamente se sabe que el estrés gestacional afecta a la expresión de este factor en el animal adulto, pero dicha modulación puede ser a la alta o a la baja en función de las áreas de corteza que se evalúen (Fumagalli y cols, 2005).

Con respecto a los receptores hipocampales de FGF de tipo I, no se encontró un efecto del estrés ni en las ratas jóvenes ni en las viejas. Fuxe y colaboradores (Fuxe y cols, 1996) encontraron que adrenalectomía producía un decremento en la expresión de los niveles del receptor para FGF de tipo 1 en algunas zonas hipocampales 24 horas después de la operación, los cuales podían restablecerse con una inyección de corticosterona.

El estrés no afectó a la expresión de NCAM pero moduló a la alta los niveles de PSA-NCAM en el hipocampo de rata

No encontramos que el estrés crónico utilizado modificara los niveles de NCAM hipocampales y corticales, ni en los animales jóvenes ni en los viejos. Se sabe que el estrés prolongado así como el tratamiento crónico con glucocorticoides es capaz, no sólo de afectar la función hipocampal, sino también alterar su estructura (McEwen, 1999) a través de la modulación, entre otras, de las moléculas de adhesión celular neural (Sandi, 2004). Estudios previos de nuestro laboratorio habían revelado que los niveles de NCAM en el hipocampo descenden significativamente al someter a las ratas a un estrés de inmovilización durante 21 días (Sandi y cols, 2001; Venero y cols, 2002; Alfonso y cols, 2006), afectando principalmente a la isoforma NCAM-140 (Touyarot y Sandi, 2002; Koo y cols, 2003; Touyarot y cols, 2004). Además, los animales que demostraron tener mayores alteraciones cognitivas inducidas por el estrés crónico eran aquellos cuyos niveles de NCAM-140 se habían visto más afectados (Touyarot y Sandi, 2002; Touyarot y cols, 2004). Es posible pensar que el estrés por inmovilización y el ECI estén actuando sobre

mecanismos neurales diferentes y eso haga que utilizando el segundo paradigma no se vea afectada la expresión NCAM hipocampal.

Estudios previos han demostrado que tanto el estrés crónico por inmovilización (Venero y cols, 2002) como la administración continuada de glucocorticoides (Sandi y Loscertales, 1999) son capaces de modular a la baja la expresión de NCAM en la corteza frontal, una estructura implicada fundamentalmente en el control de los procesos cognitivos (Mayberg, 1997; Miller y Cohen, 2001). Sin embargo, como ya se ha mencionado, nosotros no obtuvimos diferencias en cuanto a la expresión de NCAM en los sujetos jóvenes.

Con respecto a los niveles hipocampales de NCAM en los animales viejos, en la literatura encontramos que un protocolo de ECI impredecible a los 12 meses de edad indujo una disminución en la isoforma NCAM-180 cuando los animales fueron viejos (18 meses), pero no afectó a los niveles totales de NCAM en el hipocampo (Sandi y Touyarot, 2006). Tal vez, un análisis específico de cada una de las isoformas principales de NCAM tanto en el hipocampo como en la corteza habría revelado alguna diferencia entre grupos en nuestro estudio.

En relación con la expresión de PSA-NCAM hipocampal, el incremento que hemos obtenido inmediatamente tras el ECI concuerda con estudios previos en los el estrés crónico aumentaba la expresión de NCAM polisializada en el hipocampo de rata (Sandi y cols, 2001; Touyarot y Sandi, 2002; Pham y cols, 2003; Nacher y cols, 2004) lo que podría estar correspondiendo con un incremento en el número de neuronas PSA reactivas (Pham y cols, 2003). Se sabe que las largas cadenas de PSA juegan un papel importante en la remodelación estructural de las sinapsis (Sandi y cols, 2003a) y podría, por tanto, estar participando en la modificación de los contactos sinápticos que se producen en las áreas CA3 y CA1 hipocampales tras un protocolo de estrés crónico (Magarinos y cols, 1997; Stewart y cols, 2005). Atendiendo al papel que juega el PSA tanto en la neuritogénesis como en la formación de nuevas sinapsis, este incremento observado tras el estrés crónico podría corresponder con un mecanismo compensatorio o protector frente al daño neural causado por el estrés (Sandi, 2004).

El ECI que utilizamos no afectó a la expresión de PSA en la corteza frontal de la rata. Otros estudios han indicado que la administración crónica de corticosterona a una dosis capaz de inducir atrofia en las dendritas de CA3 (Woolley y cols, 1990) y alteraciones cognitivas (Luine y cols, 1994) induce un incremento en los niveles de PSA-NCAM en la corteza prefrontal (Sandi y Loscertales, 1999). Es posible que el ECI utilizado en este estudio no sea lo suficientemente severo para provocar una modulación de PSA-NCAM en la corteza frontal de rata. Otra posibilidad sería que el sistema que subyace a los cambios compensatorios inducidos por el estrés y que modulan a la alta determinadas moléculas cerebrales, se haya agotado tras mantener dicha situación durante un periodo prolongado de tiempo (Sandi y Bisaz, 2007).

1.2.4. Efecto del rasgo de ansiedad en la función cognitiva y en el comportamiento

Los animales más ansiosos presentan alteraciones en el aprendizaje espacial evaluado en el LAM

En cuanto a la contribución de la ansiedad al aprendizaje espacial en condiciones basales (ver apartado 1.2 de la discusión), comprobamos cómo bajos niveles de ansiedad favorecían el aprendizaje espacial mientras que las ratas más ansiosas resultaron ser peores tanto si habían sido estresadas como si no. Es en la segunda tanda de entrenamiento donde puede observarse claramente cómo el ECI ha separado perfectamente a los tres grupos de ansiedad en la ejecución de esta prueba. Así, los animales menos ansiosos recorrieron menos distancia a la plataforma que los otros dos grupos, aunque sólo difirieron significativamente del otro extremo de ansiedad de la población. A este respecto, se había visto en nuestro laboratorio que el estrés crónico por inmovilización eliminaba las diferencias que aparecían en el aprendizaje en el LAM entre las ratas HA y LA al dividir en dos de una población normal. La falta de concordancia en los resultados podrían deberse a que en dicho experimento el grupo de animales de ansiedad intermedia, los IA, estarían repartidos entre los HA y los LA, pudiendo eliminar así las diferencias que nosotros encontramos en el segundo día de entrenamiento. En concordancia con este resultado se ha visto que al entrenar en el LAM ratones de las cepas BALB/cByJ y C57BL/6J (las cuales difieren en sus niveles de ansiedad basales,

siendo los primeros más ansiosos que los segundos), los animales más ansiosos tardaron significativamente más tiempo en encontrar la plataforma escondida que los menos ansiosos (Francis y cols, 1995). En la prueba de memoria, no obtuvimos diferencias significativas entre los tres grupos en el porcentaje de tiempo que los animales nadaron en el cuadrante diana de la piscina, lo que nos indica que a pesar de las diferencias encontradas durante el aprendizaje, todos los grupos mostraron las mismas capacidades de memoria espacial.

Efecto del rasgo de ansiedad en memoria de reconocimiento de objetos

La prueba de reconocimiento de objetos, en comparación con otros modelos animales de aprendizaje y memoria no requiere largos entrenamientos y no induce elevados niveles de ansiedad, por lo que se considera más próximo a las condiciones bajo las que se evalúa la memoria de reconocimiento en los humanos (Ennaceur y Delacour, 1988). Como ya se ha discutido previamente, los animales clasificados en HA, IA y LA del grupo control no difieren en su memoria de reconocimiento ni cuando son jóvenes ni a los 11 meses de edad. Sin embargo, a los 4 meses de edad, el estrés al que fueron sometidos afectó de diferente forma a los grupos en función de su ansiedad. De hecho, los animales estresados con niveles altos de ansiedad obtuvieron un índice de memoria menor que el de las IA y que el de las LA y significativamente mas bajo que los animales HA que no fueron sometidos a estrés crónico. A los 11 meses de edad, de nuevo observamos que la memoria de reconocimiento de los animales HA estresados fue la más afectada por el estrés. Así pues, no sólo el estrés ha afectado globalmente la ejecución de la prueba, sino que los animales más vulnerables fueron los más ansiosos.

La prueba de alternancia espontánea no se vio afectada por el rasgo de ansiedad

La ejecución de esta prueba no se ha visto afectada por el rasgo de ansiedad ni en los animales controles ni en los estresados a pesar de que elevados niveles de ansiedad tienden a disminuir la disposición de los animales a explorar un brazo no conocido del laberinto. De hecho, se ha comprobado que la tasa de alternancia espontánea varía en función de una curva en forma de U-invertida en relación con el grado de intranquilidad que provoque el entorno en los sujetos (Lalonde, 2002). Al contrario de lo que había

ocurrido hasta ahora, en la PAE el estrés no favoreció la diferenciación de los grupos de ansiedad en función de su memoria como había ocurrido anteriormente.

Efecto del rasgo de ansiedad en la memoria de localización de objetos

Aunque el ECI al que fueron sometidos los animales en su juventud provocó un déficit en la memoria de localización de objetos a nivel global, esta diferencia se debe principalmente a que son los animales HA estresados los que se han visto más perjudicados al compararlos con las ratas HA controles. Experimentos previos con ratas Wistar (más ansiosas) y Lewis (menos ansiosas) no hallaron diferencias en la realización de esta prueba (Ennaceur y cols, 2005), lo que concuerda con nuestros resultados en las ratas controles.

Cuando los animales realizaron esta prueba tenían 22 meses de edad, lo cual podría inducirnos a pensar en un efecto deletéreo del envejecimiento más acusado en los animales con un rasgo de ansiedad elevado. De hecho, en ratones se ha visto que existe una relación entre altos niveles de ansiedad, alteraciones en el sistema inmunológico y el envejecimiento prematuro (Guayerbas y cols, 2002).

1.2.5. Reevaluación de los niveles de ansiedad

Rasgo de ansiedad

Un mes después del LAM, quisimos investigar si el rasgo de ansiedad inicial de los animales se mantenía con el tiempo (en el grupo control) y si había sido afectado por el ECI. Para ello utilizamos tanto la caja luz-oscuridad (CLO) como el campo abierto (CA). De la misma forma que el LCE, la CLO se basa en el conflicto entre la tendencia de los roedores a explorar un nuevo entorno y las propiedades aversivas de un espacio abierto e iluminado (Crawley y cols, 1985). Tanto una disminución en el tiempo que pasa el animal en el lado iluminado, como un incremento en la latencia a salir desde la zona oscura pueden ser interpretados como un incremento de la ansiedad (Finn y cols, 2003). Efectivamente, los valores obtenidos en la CLO se adecuaban a los perfiles de ansiedad inicialmente obtenidos en el LCE. En los animales que permanecieron en sus jaulas durante el periodo de estrés, el grupo 'Control', la latencia a salir a la luz correlacionó

negativamente con el porcentaje de tiempo que pasaron los animales en el LCE, pero no así el tiempo total de segundos en el compartimento iluminado. Sin embargo, ambos parámetros correlacionaron significativamente en el caso de los animales estresados. La CLO lleva intrínseco un componente ansiogénico elevado, dado que encontrarse en un espacio abierto e iluminado por una luz brillante es altamente aversivo para los roedores. Los animales control mantuvieron la pauta de salida al área iluminada en función del rasgo de ansiedad, sin embargo, el permanecer en la zona ansiogénica del aparato supone quizás un desafío demasiado importante y por tanto el estado de ansiedad de todos los animales fuera lo suficientemente elevado como para superponerse al rasgo de ansiedad. En cambio, para los animales estresados no supuso tanta novedad puesto que han tenido que enfrentarse no sólo a numerosas situaciones de estrés más nocivas, sino que ya han estado expuestos a una luz intensa durante la inmovilización en los cepos. Puede ser que por ello, este factor no haya sido limitante en el grupo de animales estresados y se mantengan la correlación con el LCE.

El hecho de que la exposición de nuestros animales a diferentes estresores durante un tiempo prolongado no haya alterado el rasgo de ansiedad de los grupos seleccionados, ha sido descrito en experimentos previos utilizando líneas seleccionadas de animales HAB y LAB tras un ECI (Neumann y cols, 2005). Se sabe que el LAM o bien descargas eléctricas en las patas suponen situaciones de estrés elevado (Hodges, 1996; Sandi y cols, 1997; Cordero y cols, 1998; Conrad y cols, 1999a) que pueden incrementar el estado de ansiedad de los sujetos (Andreatini y Bacellar, 2000; Mechiel y De Boer, 2003). Sin embargo en estos estudios, al igual que en el trabajo que nos ocupa, se constató que el rasgo de ansiedad de los animales se mantenía cuando ésta era reevaluada tras situaciones adversas como las que mencionadas o ECI en nuestro caso.

Diferentes paradigmas de estrés alteran elementos neuronales específicos de la amígdala que pueden modificar el comportamiento o incrementar la emotividad de los individuos (Vyas y cols, 2002), ya que se trata de un área fuertemente implicada en la consolidación del rasgo y del estado de ansiedad de los animales (File et al., 1998). El hecho de que el ECI no haya inducido un incremento de la ansiedad puede deberse a que

su efecto neural es diferente al inducido por el estrés por inmovilización. La bibliografía reporta que el estrés crónico por inmovilización durante 10 días consecutivos (Vyas y Chattarji, 2004) induce cambios en la estructura sináptica de la amígdala los cuales correlacionan con un incremento en la ansiedad evaluada en el LCE. Mientras que el ECI si bien afectó de forma específica a las neuronas bipolares de del NBLA, no alteró la ansiedad de los animales. Sin embargo, recientemente los mismos autores han encontrado que cuando el estrés se prolonga hasta los 21 días de duración, dichos cambios desaparecen como consecuencia, probablemente, de cambios homeostáticos que compensan el efecto aversivo inducido por el estrés (Vyas y cols, 2006).

Cuando los animales fueron sometidos a la prueba del CA, de nuevo encontramos que sólo en el grupo de animales estresados se produce una correlación entre el tiempo que los animales pasaron en la zona interna del aparato y los valores del LCE. En esta prueba se evalúa la tendencia natural de los animales a explorar un nuevo entorno para encontrar posibles salidas con el peligro de alejarse de las paredes que les ofrecen una relativa seguridad frente a los predadores. A pesar de que el tiempo de exploración en el centro del aparato puede ser interpretado como índice de la ansiedad de los animales, la validación farmacológica de esta prueba como medida ansiedad no es del todo concluyente (Finn y cols, 2003).

1.2.6. Ansiedad y niveles circulantes de corticosterona

Ansiedad y retroalimentación negativa del eje de estrés

Con el fin de estudiar cómo el estrés modulaba la actividad del eje HPA en cada uno de los grupos de ansiedad, se tomaron muestras de sangre para cuantificar el nivel de corticosterona en diferentes puntos temporales del protocolo y tras diversas pruebas. Ya hemos visto que en condiciones basales las ratas LA presentan mayores niveles de corticosterona en sangre que las IA y que las HA, y que esta diferencia se mantiene ante un estrés agudo como es el entrenamiento en el condicionamiento del miedo, prueba que utilizamos como primer estresor del paradigma. En la segunda semana de estrés, tras una hora en la plataforma elevada, los niveles de corticosterona se habían igualado en los tres

grupos. Podemos pensar que, o bien todos los grupos reaccionaron de forma similar a esta prueba estresante, o bien que tras dos semanas de estrés han empezado a producirse cambios diferenciales en el eje HHA de cada subgrupo que hagan que en este punto del protocolo los niveles de corticosterona circulantes tiendan a igualarse.

Tres semanas después de haber comenzado el ECI quisimos comprobar cómo era la activación y recuperación de la respuesta endocrina de estrés en animales tanto estresados sometidos a inmovilización, como en los controles, y dentro de ellos divididos en HA, LA e IA, a tiempo 0, 30 y 90 minutos como ya se ha explicado en el apartado 1.1.3. Dentro del grupo control, no hubo diferencias en los niveles de corticosterona entre HA, LA e IA a tiempo 0 ni a tiempo 30. Pero 90 minutos después del corte en la cola, las ratas HA mostraron niveles de corticosterona superiores a los de las ratas IA y LA. A pesar de que sus niveles basales de corticosterona de las ratas HA sean bajos, la capacidad del organismo para disminuir los niveles de corticoides circulantes tras la respuesta de estrés parece estar alterada en dichos animales. Este desajuste conllevaría una reacción exacerbada al estrés con los consiguientes efectos nocivos tanto biológicos como psicológicos (Gold y cols, 1988a).

Después de estar en los cepos, la respuesta al estrés por inmovilización de las ratas HA fue mayor que la de las ratas IA y LA 30 minutos, y que LA a los 90 minutos, evidenciando de nuevo la alteración en los mecanismos de recuperación de las ratas más ansiosas. Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio dividiendo a una población de ratas Wistar en HA y LA, donde el estrés por inmovilización de dos horas de duración produjo que las ratas más ansiosas liberaran más corticosterona que las menos ansiosas, 60 y 120 minutos después del estrés. Sin embargo, otros estudios realizados en ratas de la cepa Sprague-Dawley no han observado una relación entre las diferencias interindividuales en la liberación de corticosterona en respuesta a un estrés agudo por inmovilización, y la ansiedad mostrada por los animales en diversas pruebas (Garcia y Armario, 2001). Es importante tener en cuenta a la hora de interpretar dichos resultados que, en ocasiones, cepas diferentes de la misma especie difieren en sus niveles bioquímicos basales (Oitzl y cols, 1995), e incluso en sus

respuestas fisiológicas de estrés (Veenema y cols, 2004). A pesar de que se ha planteado que la respuesta al estrés puede considerarse un rasgo constante en el tiempo para cada individuo (Marquez y cols, 2005), a la luz de los datos obtenidos en este estudio, podemos plantear que el ECI modula los sistemas que controlan tanto la respuesta del eje HHA como los encargados de reprimir dicha respuesta en el tiempo, siendo los animales más ansiosos, los HA, los más vulnerables a sufrir un desajuste en sus mecanismos homeostáticos. Esto resultaría poco adaptativo para el animal, el cual no puede regular su respuesta emocional de manera eficiente ante las situaciones adversas. Por ello, es posible hipotetizar que las ratas HA puedan sufrir daño neural y deterioro cognitivo como consecuencia de la estimulación prolongada de los receptores de glucocorticoides por la corticosterona circulante. De hecho, hemos comprobado como las ratas HA han resultado ser las más vulnerables a los efectos nocivos del estrés y del envejecimiento al ser evaluada su memoria tanto en la PRO como en la PLO. Sin embargo, como ya se ha discutido, el ECI no alteró el rasgo de ansiedad característico de los sujetos, por lo que podríamos estar ante una prueba de cómo los circuitos biológicos que subyacen al rasgo de ansiedad no son alterados de la misma forma que aquellos que regulan la respuesta fisiológica de estrés.

Se ha postulado que cambios en los niveles de receptores de glucocorticoides hipocampales podrían estar alterando tanto la respuesta basal como de estrés de eje HHA, hecho que nosotros no hemos podido confirmar. Sin embargo, pueden existir diferencias en cualquiera de los circuitos neurales implicados en la regulación de la actividad del eje de estrés localizados en áreas como la amígdala o el tálamo (Whitnall y cols, 1993;Bhatnagar y Dallman, 1998). Por ejemplo, se sabe que el CRF estimula el eje HHA induciendo la liberación de ACTH (Rivier y Vale, 1983;Plotsky y cols, 1991). Cuando estamos ante un sistema HHA hiperreactivo, como les ocurre a las ratas tras un estrés crónico (Aguilera, 1994;Herman y cols, 1995;Ma y Aguilera, 1999) o en pacientes depresivos (Raadsheer y cols, 1994), se ha observado un incremento de la expresión de CRF del núcleo paraventricular del hipotálamo. Se ha visto que en las ratas HAB genéticamente seleccionadas se produce un incremento en la unión al receptor de CRF

tipo 2 (Wigger y cols, 2004). Además, la administración de un antagonista selectivo del receptor de tipo 1 causó efectos ansiolíticos y antidepresivos sólo en las ratas HAB (Keck y cols, 2002), lo que lleva a plantear que el receptor de tipo 1 puede estar contribuyendo al rasgo de hiper-ansiedad.

Por último, también evaluamos los niveles de corticosterona obtenidos del tronco tras el sacrificio, tanto en los animales jóvenes como en los viejos. En ninguno de los casos se observó un efecto del factor ansiedad. La ausencia de diferencias en base a la ansiedad tal y como habíamos visto hasta el momento puede deberse al método en que se ha obtenido la sangre, suceso ya documentado en la bibliografía (Marin y cols, 2007), ya que en el caso de la respuesta al estrés se ha realizado mediante un corte en la cola y tras el sacrificio se analizó la sangre del tronco.

1.2.7. Efecto de la ansiedad en los niveles bioquímicos de moléculas y receptores

Interacción entre el estrés y el rasgo de ansiedad sobre la expresión de los receptores de glucocorticoides

El ECI indujo un descenso en los niveles de receptores de tipo GR hipocampales de las ratas del grupo LA, mientras que los otros grupos de ansiedad no parecieron verse alterados. Este resultado no concuerda con los encontrados previamente en el laboratorio al dividir la población por la mitad, donde el estrés crónico por inmovilización no afectó a ninguno de los subtipos de receptores hipocampales, ni en las ratas HA ni en las LA. Es importante señalar hacia las diferencias en la edad y el protocolo seguido por ambos trabajos, ya que si bien nosotros hemos introducido recordatorios de estrés y más pruebas conductuales, los animales de nuestro estudio fueron sacrificados con 12 meses más de edad.

Con respecto a la corteza frontal, tampoco encontramos un efecto de la interacción entre el estrés y el rasgo de ansiedad sobre la expresión de GRs. En la literatura sólo encontramos cómo la manipulación neonatal disminuye la ansiedad en el animal adulto e incrementa los niveles del receptor de glucocorticoides (Durand y cols, 1998).

El rasgo ansiedad no parece haber influido en la expresión de receptores hipocampales y corticales de tipo MR, como ya se ha comentado previamente en el

apartado 1.1.2. de esta sección. Tampoco el ECI afectó a los niveles de dichos receptores en la corteza en función de la ansiedad de los animales. La literatura no ofrece datos acerca del efecto específico del estrés sobre los receptores de glucocorticoides en función del rasgo de ansiedad de los animales.

Relación entre la ansiedad y los niveles de FGF-R1 hipocampales

En nuestro estudio, los niveles de FGF no fueron distintos en el hipocampo de los distintos subgrupos de ansiedad de los animales jóvenes. En contra de nuestros resultados, recientemente se ha relacionado una baja ansiedad con niveles elevados de este factor neurotrófico en el hipocampo. Turner y colaboradores (Turner y cols, 2006) observaron que el ambiente enriquecido disminuye la ansiedad de los animales e incrementa los niveles de FGF-2 en el giro dentado del hipocampo, lo que parece indicar que este factor neurotrófico pueda estar ejerciendo cierto efecto ansiolítico. Además, algunos ansiolíticos inducen incrementos en los niveles hipocampales de ARNm de FGF-2 (Gomez-Pinilla y cols, 2000). El hecho de que el estrés no module significativamente los niveles de FGF hipocampales pero reduzca la ansiedad de los animales hace difícil sacar conclusiones sobre el posible efecto ansiolítico del FGF. En cuanto a los análisis realizados en la corteza, los animales HA controles presentaron mayores niveles de FGF que los IA y LA. Sin embargo, a la luz de los datos obtenidos y la información aportada por la literatura, es difícil interpretar los resultados.

Los animales jóvenes LA, tanto los estresados como los controles, mostraron tener una expresión menor de receptores para FGF tipo 1 en el hipocampo que los animales IA y HA. Sin embargo, sus niveles se igualaron con los de los otros grupos al llegar a la vejez. En este caso podría tratarse de un efecto compensatorio en los animales menos ansiosos, puesto que expresan mayores niveles de NCAM hipocampal y se sabe que dicha molécula interacciona con el FGF-R1 mediando vías de supervivencia celular (Niethammer y cols, 2002). Con respecto a la corteza, el rasgo de ansiedad no ha sido determinante para marcar diferencias en la expresión del receptor, únicamente destacar que los animales IA controles y LA estresados han resultado ser más vulnerables al efecto del envejecimiento. Hasta el día de hoy, no existen estudios previos que indiquen si la ansiedad afecta a la

expresión del FGF-R1 en corteza.

Ansiedad y niveles de NCAM

Los animales jóvenes con menores niveles de ansiedad, los LA, expresaron mayores niveles de NCAM en el hipocampo tras el estrés. Experimentos previos en nuestro laboratorio habían demostrado que al someter a los animales a estrés crónico por inmovilización, los sujetos más ansiosos expresaban mayores niveles de NCAM hipocampal, mientras que en nuestro caso el ECI diferenció los extremos de la población pero favoreciendo la expresión de NCAM en el hipocampo de las ratas LA. La diferencia encontrada entre ambos estudios puede deberse a los protocolos de estrés utilizados.

En la corteza frontal, encontramos el efecto contrario, ya que el estrés indujo un incremento en los niveles de NCAM en las ratas HA jóvenes. Ambos casos podrían obedecer a un mecanismo compensatorio, puesto que, como ya se ha mencionado, la interacción de NCAM con los receptores de FGF de tipo 1 activa vías de supervivencia celular (Niethammer y cols, 2002)..

No obtuvimos diferencias entre los tres grupos en los valores obtenidos de PSA-NCAM ni en el hipocampo ni en la corteza frontal en ninguna de las condiciones estudiadas. En el trabajo de Sandi y Touyarot (2006), tampoco se encontraron diferencias entre los animales sometidos a un estrés similar y los controles ni tampoco en función de su clasificación en HR y LR en función de la reactividad de los sujetos a un ambiente novedoso.

1.2.8. Efecto del envejecimiento en la función cognitiva

El envejecimiento alteró la memoria para el reconocimiento de objetos

En los animales viejos se observa un deterioro general de la memoria de reconocimiento de objetos. Un efecto similar se ha comprobado en ratas de 21 meses de la cepa Fischer (Wallace y cols, 2007). Es importante recordar que los animales HA han sido aquellos cuya memoria de reconocimiento de objetos ha resultado ser más vulnerable a los efectos deletéreos del estrés y del envejecimiento.

1.2.9. Efecto del envejecimiento en la corticosterona

Diversos estudios han observado que los animales viejos muestran problemas a la hora de adaptar sus respuestas de estrés (Sapolsky y Altmann, 1991) puesto que su mecanismo de retroalimentación negativa a través del hipocampo parece estar alterado. Un estudio reciente encontró que las ratas viejas muestran un descenso en los niveles de ARNm del receptor para glucocorticoides en el hipocampo y áreas corticales relacionadas, lo cual parece participar en el déficit de la respuesta al estrés y la pérdida de funciones cognitivas (Bizon y cols, 2001); resultados similares se han encontrado utilizando un modelo de ratón prematuramente envejecido (Perez-Alvarez y cols, 2005). Se ha planteado que la alteración en la función del eje de estrés en los ratones prematuramente envejecidos pudiera estar relacionada con los cambios encontrados en el sistema monoaminérgico de dichos ratones (De la Fuente y cols, 2003). Paradójicamente, nuestros animales viejos resultaron tener niveles de corticosterona menores que los animales jóvenes en el momento del sacrificio. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que este resultado global viene determinado por el descenso en los niveles de corticosterona de los animales viejos estresados, ya que si comparamos únicamente los controles, los animales de 24 meses muestran niveles incrementados de corticosterona plasmática tal y como se esperaba, tendiendo dicha diferencia a la significación.

1.2.10. Efecto del envejecimiento en los niveles bioquímicos de moléculas y receptores

El envejecimiento alteró los niveles de MRs hipocampales así como de los MRs y los GRs en corteza frontal

Se sabe que el envejecimiento disminuye los niveles del receptor tipo GR en el hipocampo, proceso que estaría subyaciendo al deterioro en el freno de la respuesta de estrés en los individuos viejos (Van Eekelen y cols, 1991; Landfield y Eldridge, 1991; Hassan y cols, 1999). En nuestro caso, no hemos visto este descenso pero hay que tener en cuenta que tanto el aprendizaje como la manipulación pueden incrementar los niveles de GR hipocampales (Herrero y cols, 2006). Según el protocolo utilizado en este estudio, cuando las ratas llegaron a los 24 meses de edad habían pasado por varias

pruebas de aprendizaje y memoria, además de la manipulación a la que eran sometidas para ser pesadas y numeradas y las pruebas puntuales de estrés en el grupo correspondiente. A pesar de que se dejó un tiempo antes del sacrificio con el fin de evitar cualquier interferencia de dichas pruebas en las medidas, puede haberse producido una compensación progresiva. También es importante recalcar que estudios recientes apuntan a que el envejecimiento no afecta por igual a los niveles de GR en todas las áreas hipocampales ni a todas las edades en ratas Fischer. Mientras que a los 15 meses de edad se observó un descenso en la expresión de GRs en CA1 y CA3, pero no en GD, con respecto a individuos jóvenes, al llegar a los 30 meses de edad estas diferencias habían desaparecido en todas las áreas estudiadas (Murphy y cols, 2002). Por tanto, la ausencia de efecto en nuestros resultados podría deberse también al hecho de haber usado homogenados de hipocampo, que puede diluir el efecto sobre áreas concretas y/o el encontrarnos en una ventana de tiempo en la que la ya habían desaparecido las posibles diferencias debidas a la edad. No obtuvimos tampoco diferencias en cuanto a los niveles de estos receptores en la corteza frontal. Estudios previos encontraron que solamente las ratas viejas con déficits cognitivos exhibían significativamente menores de GRs en la corteza prefrontal medial que los animales jóvenes. Sin embargo este decremento no se vio en aquellos individuos que mantenían su capacidad cognitiva en la vejez (Bizon y cols, 2001). Puesto que no hemos evaluado simultáneamente cómo de conservada está la capacidad de memoria y aprendizaje en nuestras ratas viejas con respecto a las jóvenes, es difícil interpretar los resultados obtenidos en función a los resultados de Bizon y colaboradores. Otro estudio reciente, esta vez en humanos, encontró un detrimento en los niveles de ARNm de GR en la corteza prefrontal con el envejecimiento, pero únicamente en algunas capas de corteza (Perlman y cols, 2007). Actualmente se está trabajando con un modelo de ratón mutante que sobreexpresa receptores de glucocorticoides de tipo GR en todo el cerebro y que presenta alterada su respuesta neuroendocrina de una forma similar a la que sucede en animales viejos, por lo que se ha considerado este fenotipo como un modelo de envejecimiento prematuro (Wei y cols, 2007).

A los 24 meses de edad, los animales presentaron un descenso en la expresión de

los MRs hipocampales y un incremento de la expresión en corteza. Nuestros resultados coinciden con diversos estudios científicos en los que se indica que durante el envejecimiento disminuye la síntesis de receptores de mineralocorticoides en el área hipocampal (Hassan y cols, 1999;Yau y cols, 2002;Meijer y cols, 2005). Por otro lado, no todos los estudios coinciden con estos datos, puesto que Murphy y colaboradores (Murphy y cols, 2002) no vieron diferencias en la expresión de MR hipocampal ni a los 15 ni a los 30 meses de edad en ratas Fischer. Asimismo, no se han encontrado diferencias en la expresión de MR en la corteza de ratas Wistar de 24 meses con respecto a las ratas jóvenes (Meijer y cols, 2005).

En un estudio reciente del que ya hemos hablado anteriormente, Sandi y Touyarot (2006) clasificando a las ratas en HR y LR vieron que el ECI no afectaba a los receptores de tipo GR, pero sí indujo un incremento en los niveles de MR en el hipocampo de las ratas LR estresadas, que podría reflejar un mecanismo compensatorio frente al exceso de glucocorticoides. Hay que recalcar sin embargo la diferencia de edad de los animales utilizados en cada estudio así como la distinta forma de clasificación de los mismos, lo cual puede influir en que no encontremos las mismas diferencias.

Envejecimiento y niveles de FGF y de su receptor FGFR1

En la actualidad, los efectos del envejecimiento sobre la expresión de FGF no están claros. Salik y colaboradores (Salik y cols, 2005) encontraron que el envejecimiento disminuía el número de células que expresan FGF en el hipocampo de las ratas viejas lo que se traduciría en un deterioro en la función astrocitaria y por tanto en el control de las interacciones sinápticas entre neuronas y astrocitos. Sin embargo, al igual que Belluardo y colaboradores (Belluardo y cols, 2004) nosotros no vimos diferencias en los niveles hipocampales de FGF atribuibles al envejecimiento. En nuestro caso podría deberse, como ya se ha comentado, a que las ratas hayan sido expuestas a numerosas pruebas de aprendizaje y memoria. Sin embargo, hemos encontrado un incremento de los niveles de FGF en la corteza frontal de los animales viejos al mismo tiempo que se observó una bajada en la expresión de su receptor tipo 1, lo que podría estar indicando un mecanismo compensatorio por alguna de las dos partes.

La expresión de NCAM y PSA-NCAM se ve favorecida por el envejecimiento

El envejecimiento ha incrementado la expresión de NCAM tanto en el hipocampo como en la corteza frontal, hecho que apoya el incremento de esta molécula encontrado por Linnemann y Skarsfelt (Linnemann y Skarsfelt, 1994) en diversas regiones cerebrales examinadas en ratas senescentes. Este incremento, como ya se ha discutido previamente, puede deberse a la participación de NCAM en los procesos de neuroplasticidad y por tanto un posible papel compensatorio de los procesos degenerativos asociados al envejecimiento.

Estudios previos no han demostrado que se altere la expresión de PSA-NCAM con el envejecimiento ni en todo el cerebro ni particularmente en el hipocampo (Abrous y cols, 1997). Sin embargo, nosotros encontramos un incremento en los niveles de NCAM polisializada en el hipocampo de las ratas viejas en comparación con las ratas jóvenes. Nuestro grupo comprobó recientemente que tras el aprendizaje y memoria espacial los niveles hipocampales de estas moléculas aumentaban (Venero y cols, 2006), si bien dichos cambios son transitorios y vuelven a niveles basales a los pocos días de concluir el entrenamiento. Dado que se dejó pasar más de 1 mes entre la última prueba de aprendizaje y el momento del sacrificio, esta posibilidad parece poco probable.

También existe la posibilidad de que, durante el envejecimiento, estas moléculas se regulen de manera diferencial en distintas áreas de cerebro. Un estudio reciente ha analizado la expresión de PSA-NCAM en las diversas regiones del área hipocampal en animales jóvenes, adultos y viejos, y ha comprobado que mientras que en neuronas granulares del giro dentado se produce un decremento drástico de la expresión de PSA-NCAM con la edad, en las neuronas no granulares este efecto es justamente el contrario, observándose desde la edad adulta un aumento de los niveles de PSA-NCAM hasta llegar a la vejez. En el estrato lúcido, la forma de NCAM polisializada se reguló a la baja, mientras que en el resto de los estratos no hay cambios con la edad (Varea y cols, 2007). Por tanto el análisis realizado en nuestro estudio a partir de homogenados de hipocampo completo puede no ser un fiel reflejo de lo que está ocurriendo en cada una de las zonas independientemente.

Discusión

Igualmente, en la corteza prefrontal medial se ha encontrado una regulación diferencial para cada una de las capas, tendiendo a una reducción global de la expresión de PSA-NCAM en la vejez (Varea y cols, 2007), dato que contrasta con el encontrado en nuestro estudio donde, al igual que vimos en el hipocampo, los animales de 24 meses tienden a expresar más PSA-NCAM que los jóvenes.

2. Estudio del efecto del FGL sobre el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica. Papel neuroprotector del FGL frente al daño inducido por el estrés crónico

2.1. Efecto del FGL en el aprendizaje espacial y la memoria espacial

2.1.1. Potenciación del aprendizaje espacial por el péptido FGL

En la primera parte de este estudio hemos demostrado el efecto facilitador de la administración periférica del FGL, un péptido mimético de NCAM, sobre el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. Los resultados muestran que durante la fase de adquisición las ratas tratadas con el péptido FGL 2 y 5 días antes del entrenamiento recorrieron una menor distancia para encontrar la plataforma sumergida que los animales que recibieron el vehículo. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos en la prueba de retención realizada para comprobar el grado de memoria espacial. En un trabajo previo, realizado en nuestro laboratorio, se había demostrado que la administración intracerebroventricular del FGL, inmediatamente después del entrenamiento, favorecía la memoria a largo plazo en dos pruebas dependientes de hipocampo (laberinto acuático de Morris y el condicionamiento del miedo al contexto) (Cambon y cols, 2004). En ese estudio se observó que las ratas que habían recibido el FGL presentaban una latencia significativamente menor para encontrar la plataforma en el primer ensayo del segundo día de entrenamiento, así como en el test de retención realizado 24 horas después.

El hecho de que en el presente estudio hayamos observado una potenciación del aprendizaje, pero no de la memoria espacial, puede ser debido a varios factores. En primer lugar, la administración se ha hecho de manera periférica, mientras que en el estudio de Cambon y colaboradores (2004) se había realizado intracerebroventricularmente. Por tanto, es posible que la cantidad de péptido que llegue al cerebro no sea la misma cuando se hace de manera periférica o central. No obstante, hay que indicar que las dosis utilizadas han sido previamente seleccionadas a partir de varios experimentos piloto. En ellos, se habían probado distintas dosis de péptido FGL administrado subcutáneamente y se habían obtenido muestras del péptido mediante microdiálisis, poniéndose de manifiesto que al

cabo de 30 minutos de una inyección de FGL 6,6 mg/ml, los niveles de péptido FGL en el líquido cefalorraquídeo eran similares a los obtenidos mediante la inyección i.c.v. de 5 µg empleada en experimentos previos (Cambon y cols, 2004). En segundo lugar, la facilitación de la memoria espacial por el péptido FGL se produjo cuando la inyección central se hizo inmediatamente después de cada sesión de entrenamiento, lo cual indicaba que el péptido estaba favoreciendo el almacenamiento de la memoria espacial, posiblemente al afectar a la cascada de señales moleculares desencadenadas por el entrenamiento y que van a implicar la reorganización de los substratos neurales de la memoria a largo plazo. Sin embargo, en el presente estudio, la administración del péptido fue antes del entrenamiento espacial, lo cual nos ha permitido poner de manifiesto que el péptido, inyectado periféricamente es capaz de potenciar las capacidades de aprendizaje espacial de los animales.

La modulación de los niveles de NCAM en otros tipos de aprendizaje dependiente del hipocampo ha sido puesta de manifiesto recientemente por un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación. Así, se ha demostrado que tras la prueba de discriminación de olores, en la que la rata aprende a asociar un olor determinado con una recompensa (Staubli y cols, 1987; Saar y cols, 1998), se produce una modulación de NCAM. En concreto, se encontró que en el tercer día de entrenamiento, existía una correlación positiva entre la capacidad de aprendizaje de las ratas y los niveles de NCAM tanto en el hipocampo, como en la corteza piriforme (Knafo y cols, 2005). Así, se ha sugerido que el aumento en la expresión de NCAM en regiones específicas durante las primeras fases del aprendizaje podría estar facilitando la plasticidad sináptica que se requiere para la consolidación del aprendizaje de discriminación de olores. Por tanto, el grado de expresión de NCAM en las sinapsis pudiera ser un factor determinante en la capacidad de los animales para aprender. Estos datos apoyarían la hipótesis de que el tratamiento periférico con FGL estaría favoreciendo la función sináptica y, por tanto, el aprendizaje de los animales en el laberinto acuático de Morris.

Dado que la prueba del laberinto acuático de Morris es claramente dependiente de la integridad y buen funcionamiento de la función hipocampal (Morris y cols, 1982; Lathe,

2001), es lógico pensar que el péptido FGL administrado subcutáneamente, es capaz de alcanzar el cerebro y, posiblemente, podría estar actuando sobre el hipocampo. No obstante, no podemos descartar que este péptido pueda estar actuando también sobre otras regiones cerebrales como la amígdala. De hecho, en un estudio anterior (Cambon y cols, 2004), se ha podido constatar que la administración del FGL después del entrenamiento del condicionamiento del miedo al tono, (una prueba que es independiente de la función hipocampal pero que requiere de la amígdala), potencia el establecimiento de esa memoria emocional.

En resumen, podría hipotetizarse que el FGL administrado antes del entrenamiento es capaz de mejorar la función presináptica y/o la formación de sinapsis dos mecanismos que representan formas funcionales y estructurales de procesos de plasticidad sináptica subyacentes a procesos de aprendizaje y memoria (Milner y cols, 1998; Martin y cols, 2000). Por tanto, el FGL podría propiciar cambios neuronales que mejorarían el substrato neural sobre el que se va a asentar el proceso cognitivo y que tendrían como consecuencia final que el aprendizaje espacial se pueda producir de una manera más eficaz.

2.2. Efecto de la administración de FGL sobre el número de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo

2.2.1. Efecto del FGL sobre la densidad de espinas dendríticas en CA1 del hipocampo

Hemos encontrado un incremento en la densidad de las espinas dendríticas basales del giro dentado del hipocampo en las 50 μm mas distales. En un estudio mas detallado, se ha observado que la mayoría de esas espinas tienen una cabeza de pequeño volumen (Knafo y cols, 2008). Se ha visto que este tipo de espinas son menos estables y más plásticas que las espinas de mayor tamaño (Trachtenberg y cols, 2002; Kasai y cols, 2003; De Roo y cols, 2008). El tamaño de la cabeza de una espina dendrítica se relaciona con la magnitud de las señales transmitidas (Harris y Stevens, 1989; Murthy y cols, 2000) por lo que los cambios en el volumen de las cabezas podría relacionarse con la modulación de eficacia sináptica. Las sinapsis que se producen sobre

estas espinas se conocen como 'sinapsis silentes' (Matsuzaki y cols, 2001; Hayashi y Majewska, 2005) y se ha propuesto que participan en la plasticidad de la transmisión sináptica (Isaac, 2003) y que, además, son susceptibles de cambiar con la experiencia. Las nuevas espinas inducidas por el tratamiento con FGL podrían incrementar la plasticidad sináptica de la región CA1 del hipocampo, lo que estaría favoreciendo el aprendizaje espacial. El hecho de que el incremento en la densidad de espinas haya sido mayor en la región distal de las dendritas basales sugiere que tal vez estén modulando circuitos específicos.

2.3. El FGL previene el daño cognitivo provocado por el estrés crónico y asociado al envejecimiento

2.3.1. El FGL previene las alteraciones cognitivas inducidas por el estrés durante el envejecimiento

La exposición continuada a situaciones estresantes puede acelerar el deterioro cognitivo durante el proceso de envejecimiento (Porter y Landfield, 1998; McEwen, 2002; Wilson y cols, 2003; Wilson y cols, 2005). Un estudio reciente ha revelado alteraciones cognitivas en animales de 18 meses de edad que habían sido sometidos a un protocolo de estrés crónico cuando eran adultos (Sandi y Touyarot, 2006). En este estudio quisimos comprobar el potencial efecto neuroprotector del FGL, administrándolo durante un protocolo de ECI a ratas de 12 meses, cuyas capacidades cognitivas así como la tasa de proliferación celular en el hipocampo fueron evaluadas 6 meses después.

Cuando evaluamos a los animales en el LAM a los 18 meses de edad, los animales estresados mostraron una peor curva de aprendizaje que los controles el segundo día de entrenamiento. Es más, los animales estresados que fueron tratados con vehículo mostraron un déficit en la prueba de memoria espacial. Dichos efectos no pueden atribuirse a alteraciones visuales, puesto que los dos animales que no realizaron correctamente la versión de la plataforma visible en el laberinto acuático fueron excluidos de los análisis estadísticos (Borcel y cols, 2008). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos recientemente que apuntan a que el ECI durante la edad adulta no sólo es capaz de incrementar el daño cognitivo observado en individuos viejos sino que también

acelera su aparición (Sandi y Touyarot, 2006), acelerando la pérdida de la capacidad cognitiva espacial durante la senectud.

Existen otros estudios que apoyan el hecho de que la edad adulta es un periodo especialmente vulnerable a la exposición prolongada de altos niveles de glucocorticoides y/o situación estresantes, induciendo cambios morfológicos en el hipocampo y alteraciones cognitivas más evidentes que las encontradas en ratas jóvenes sometidas al mismo tratamiento (Levy y cols, 1994; Landfield y Eldridge, 1994; Bodnoff y cols, 1995). En cambio, la adrenalectomía combinada con un tratamiento con corticosterona para alcanzar niveles basales, atenúa la pérdida de neuronas así como los déficits en aprendizaje y memoria durante el envejecimiento (Bodnoff y cols, 1995). La vulnerabilidad de las ratas adulta al estrés puede estar relacionada con el mal funcionamiento del proceso de retroalimentación negativa del eje HHA (Heine y cols, 2004), que induce una respuesta exagerada al estrés en los animales viejos (Kerr y cols, 1991; Landfield y Eldridge, 1994) que participa en el daño neural y la pérdida de funciones cognitivas (Issa y cols, 1990).

Quisimos estudiar si la administración de FGL durante las 4 semanas que duró el ECI era capaz de prevenir el déficit en la memoria espacial encontrado en la senescencia. En comparación con las ratas estresadas tratadas con vehículo, las ratas estresadas que recibieron FGL mostraron mejor memoria espacial a los 18 meses de edad. De hecho, sus resultados en la prueba de memoria del LAM fueron de la misma magnitud que los obtenidos por las ratas control (Borcel y cols, 2008). Previamente, se había comprobado que la administración central de FGL mejoraba la realización de diversas pruebas espaciales en ratas adultas, incluyendo la realizada en el presente estudio, el LAM (Cambon y cols, 2004; Secher y cols, 2006) lo que apuntó al hipocampo como posible diana de este péptido.

El hecho de no haber encontrado ningún efecto del tratamiento en las ratas control podría ser debido a que a los 18 meses de edad sus capacidades cognitivas pueden haber permanecido relativamente bien conservadas (Markowska y cols, 1998; Wyss y cols, 2000; Cambon y cols, 2004) o bien que el efecto beneficioso del FGL únicamente se manifiesta cuando la función cognitiva se encuentra realmente comprometida, como por

ejemplo, tras un protocolo de estrés crónico. Si bien es cierto que el FGL fue administrado 6 meses antes de la prueba de memoria, podríamos hipotetizar que hubiera contrarrestado el daño inducido por el ECI durante esos 28 días en los que fue administrado.

2.3.2. El estrés crónico en la edad adulta reduce la supervivencia de las nuevas células generadas en el hipocampo: efecto preventivo del FGL

Otro de los resultados encontrados en este estudio, ha sido que el ECI a los 12 meses indujo una reducción en el número de células nacidas en el giro dentado del hipocampo a los 20 meses de edad (Borcel y cols, 2008). Es más, encontramos una correlación positiva entre el número de células BrdU positivas y la memoria espacial evaluada en el LAM, resultado que concuerda con estudios previos realizados en ratas viejas (Drapeau y cols, 2003). Es poco probable que el aprendizaje en espacial en el laberinto acuático haya podido influir en la supervivencia celular en el hipocampo, puesto que el BrdU fue administrado 3 semanas después del LAM. Además, existen datos que demuestran que incluso 4 días de entrenamiento espacial no afectan a la neurogénesis en el hipocampo (Mohapel y cols, 2006).

El proceso de neurogénesis es necesario para algunas pruebas dependientes de hipocampo, entre ellas el LAM (Snyder y cols, 2005), incluso se ha visto una correlación entre la capacidad de aprendizaje y la neurogénesis en el hipocampo (Kempermann y cols, 1998; Gould y Tanapat, 1999; Merrill y cols, 2003). El decremento en la tasa de neurogénesis parece ser uno de los factores que contribuyen a la pérdida en las capacidades cognitivas de los individuos viejos (Kuhn y cols, 1996; Drapeau y cols, 2003). A pesar de la extensa bibliografía acerca del efecto nocivo tanto del estrés (Seki y Arai, 1995; Lee y cols, 2002; Malberg y Duman, 2003; Pham y cols, 2003; Bain y cols, 2004; Dong y cols, 2004) como de la edad (Seki y Arai, 1995; Kuhn y cols, 1996; Cameron y McKay, 1999) sobre la neurogénesis, no hay muchos datos acerca de su interacción. Es más, el déficit en la memoria espacial encontrado en las ratas senescentes parece estar relacionado con la menor supervivencia de las nuevas neuronas generadas (Drapeau y cols, 2003; Merrill y cols, 2003; Bizon y Gallagher, 2003; Jin y cols, 2004; Montaron y cols, 2006; Wati y cols, 2006).

En nuestro estudio hemos encontrado que las ratas estresadas exhibían un menor número de células nuevas en el hipocampo, lo que podría estar alterando su correcto funcionamiento (Borcel y cols, 2008). En la misma línea, se ha comprobado que el estrés en las etapas más tempranas de la vida puede disminuir la capacidad de ejecutar correctamente pruebas dependientes del hipocampo, así como reducir la neurogénesis en el adulto, probablemente debido a cambios en el eje HHA perdurables en el tiempo (Mirescu y cols, 2004;Karten y cols, 2005).

Numerosos estudios han apuntado a los glucocorticoides como uno de los factores reguladores de la neurogénesis en el hipocampo, ya que la supresión en la secreción de los mismos la aumenta (Cameron y cols, 1998;Cameron y McKay, 1999) y la administración de corticosterona tiene el efecto contrario (Gould y cols, 1991;Cameron y Gould, 1994). Interesantemente, se ha demostrado que la exposición a los glucocorticoides durante la vida de los individuos puede determinar la bajada en la tasa de neurogénesis hipocampal y el deterioro cognitivo durante el envejecimiento (Montaron y cols, 2006). Por tanto, la disminución en la supervivencia de las células formadas en el GD de las ratas viejas que fueron sometidas a estrés podría ser consecuencia directa del efecto de los glucocorticoides sobre las células progenitoras, produciendo la pérdida de células y/o la interrupción de sus ciclos celulares. Se ha visto que la activación de los receptores tipo GR no sólo reduce el número de células en proliferación en la zona subgranular del GD (Kim y cols, 2004;Wong y Herbert, 2005) sino que también incrementa los niveles de p27Kip1, un factor de inhibición del ciclo celular (Heine y cols, 2004). Otro de los posibles mecanismos estaría mediado por la vía del receptor NMDA, ya que tanto el estrés como los glucocorticoides incrementan la neurotransmisión excitatoria del hipocampo (Lowy y cols, 1993;Moghaddam y cols, 1994;Venero y Borrell, 1999), lo cual puede conducir a una reducción en la tasa de neurogénesis (Gould y cols, 1997;Cameron y cols, 1998;Nacher y McEwen, 2006).

2.3.3. Pérdida de neuronas granulares inducida por estrés en la vejez

Utilizando métodos estereológicos encontramos que el estrés crónico en la edad adulta afectó al número de células granulares del GD durante el envejecimiento (Borcel y cols, 2008). Los datos al respecto no son homogéneos, puesto que si bien se ha encontrado que la continua exposición al estrés o/y a elevados niveles de glucocorticoides pueden dar lugar a una neurodegeneración irreversible en el hipocampo (Sapolsky, 1985;Uno y cols, 1989;Uno y cols, 1990) probablemente mediante apoptosis (Reagan y McEwen, 1997;Raff, 1998;Sapolsky, 1999), otros autores no han visto efectos significativos sobre la muerte neuronal (Vollmann-Honsdorf y cols, 1997;Sousa N., 1998;Leverenz y cols, 1999;Lucassen y cols, 2001). Según nuestros datos, el ECI a los 12 meses de edad redujo el número de células granulares en el hipocampo en los animales viejos, al mismo tiempo que redujo la supervivencia celular, lo que apunta a que tanto los procesos de generación como de muerte celular se han visto afectados por el estrés. Estudios previos afirman que el proceso de cambio celular en el hipocampo es altamente sensible al estrés (Gould y cols, 1997;Fuchs y Flugge, 1998;Gould y cols, 1998;Joels y cols, 2004) y a las variaciones en los niveles circulantes de glucocorticoides (Cameron y Gould, 1996;Montaron y cols, 1999;Biebl y cols, 2000). Puesto que las ratas estresadas tienen menos células granulares que las controles, podríamos especular que dicha pérdida de neuronas fuera la responsable de las alteraciones cognitivas observadas en este estudio. Sin embargo, aunque la reducción en el número de células granulares debería haber afectado al volumen del hipocampo, no se vieron variaciones en el mismo ni en volumen del GD entre grupos (Borcel y cols, 2008). Se ha comprobado que se requiere de una exposición continuada a un estrés severo para inducir sólo una mínima reducción en el volumen del hipocampo, proceso que puede ser revertido tras un periodo de recuperación (Heine y cols, 2004;Lucassen y cols, 2006).

2.3.4. Posible mecanismo de acción del FGL

El potencial terapéutico del FGL previniendo los efectos del ECI sobre el aprendizaje y la memoria así como sobre la supervivencia celular está probablemente

relacionado con la capacidad de este péptido de activar al receptor FGF-R1, lo cual se ha comprobado en experimentos tanto *in vitro* (Kiselyov y cols, 2003) como *in vivo*. Se sabe que el ligando endógeno de este receptor, el FGF-2, participa tanto en la diferenciación como en la supervivencia de las células progenitoras tanto *in vitro* como *in vivo* (Kuhn y cols, 1996;Kuhn y cols, 1997), y recientemente se ha descubierto que el FGF-R1 juega un papel importante en la neurogénesis (Zhao y cols, 2007). En función de lo anteriormente expuesto, sería razonable pensar que la administración crónica de FGL pudiera estar facilitando la supervivencia de las nuevas células formadas en el giro dentado. Es bien conocido que el estrés se asocia con cambios en el hipocampo que afectan a su fisiología y plasticidad (Magariños y McEwen, 1995;McEwen, 1999;Sousa y cols, 2000;McEwen, 2000;Sandi, 2004;Joels y cols, 2004;Cordero y cols, 2005), así como a alteraciones en otras áreas cerebrales que contribuyen también a los cambios deletéreos asociados con el envejecimiento (Rapp y Amaral, 1992;Barnes, 1993;Rapp y cols, 1999;Smith y cols, 2000;D'Hooge y De Deyn, 2001).

Discusión general

En la primera parte del estudio hemos visto cómo la función del eje HHA estaría subyaciendo al establecimiento de los rasgos de ansiedad de los animales. En contra de lo que esperábamos, los animales menos ansiosos, los LA han mostrado tener mayores niveles de corticosterona basales que los HA. El hecho de extirpar las glándulas adrenales y mantener artificialmente unos niveles bajos y constantes de corticosterona favoreció la desaparición de los grupos de ansiedad. Así, todos los animales se comportaron como HAs al ser evaluada su ansiedad en la caja luz-oscuridad, siendo precisamente este grupo el que en condiciones basales mostró bajos niveles de glucocorticoides. Podemos confirmar también que nos encontramos ante un rasgo de ansiedad puesto que los animales han mantenido su comportamiento más o menos ansioso incluso después de haber pasado por un estrés crónico.

También comprobamos cómo las diferencias interindividuales en el rasgo de

ansiedad de los animales pueden influir en sus capacidades cognitivas pero de forma específica para algunos tipos de memoria. Así, las ratas HA han demostrado desarrollar una peor estrategia de aprendizaje espacial en el laberinto acuático así como un peor establecimiento de la memoria emocional en el paradigma de condicionamiento de miedo al tono. A partir de diversas aproximaciones experimentales hemos llegado a la conclusión de que la corticosterona no sería el principal factor que estaría influyendo en la fuerza de consolidación de dicha memoria aversiva, sino que otros factores serían los responsables de la alteración en los mecanismos atencionales que hemos encontrado en dichos animales. Uno de los candidatos parece ser el sistema noradrenérgico, puesto que un estrés agudo leve, como es una inyección con suero salino, es capaz de favorecer la activación de este sistema haciendo que los sujetos más ansiosos sean capaces de condicionar con la misma intensidad que los menos ansiosos, aunque debemos plantear la participación de otros sistemas de neurotransmisores como el CRF.

A pesar de que son los animales LA los que presentan los más altos niveles de glucocorticoides basales, han demostrado tener un sistema de retroalimentación negativa del eje es más eficaz que el de los HA. Es posible que la falta de efectividad a la hora de frenar la respuesta de estrés haga que estos últimos sean más sensibles al daño neuronal resultante de la exposición prolongada a los glucocorticoides, dado que los animales más ansiosos han resultado ser más vulnerables al deterioro cognitivo inducido por el estrés crónico y por el envejecimiento.

El estrés crónico variable ha resultado no tener los mismos efectos cognitivos y neuroquímicos que el estrés crónico por inmovilización. De hecho, no hemos obtenido el mismo patrón de alteraciones bioquímicas en el cerebro que las publicadas con respecto a dicho paradigma. Si bien el ECI ha mermado la capacidad de los animales a la hora de realizar con éxito pruebas cognitivas como la PRO, la PLO o la PAS incluso meses después de la finalización del protocolo, no afectó a la memoria espacial de los animales en el laberinto acuático. Aún así, el ECI tendió a separar los tres grupos de ansiedad en función de su ejecución de forma específica para algunas pruebas – el LAM y la PRO – revelando la ya comentada diferente vulnerabilidad de los animales al estrés y al

envejecimiento según su ansiedad interindividual.

El paso del tiempo ha modulado la expresión de diversos factores bioquímicos estudiados, tendiendo en la mayoría de los casos hacia un efecto compensatorio y encaminado a proteger el cerebro de dicho deterioro, como es el caso de PSA-NCAM y el factor de crecimiento de fibroblastos y su receptor.

Habiendo comprobado el efecto neuroprotector del FGL frente al ECI se pueden plantear objetivos hacia el desarrollo de fármacos que prevengan o atenúen los déficits cognitivos inducidos por el estrés y puedan ejercer además, un efecto beneficioso frente al envejecimiento cerebral. Incluso si nos basamos en los datos obtenidos en la primera parte de esta tesis podemos establecer un nuevo punto de partida. La mayor expresión del receptor de FGF de tipo 1 hipocampal en las ratas HA y su mayor vulnerabilidad al estrés y al envejecimiento las hace candidatas a ser más sensibles también a los efectos beneficiosos del FGL.

VI. Conclusiones

Conclusiones

Los resultados de esta Tesis, obtenidos con ratas macho de la cepa Wistar, nos permiten proponer las siguientes conclusiones:

1. Las diferencias individuales en los niveles de ansiedad que se observan en estos animales están acompañadas por una diferente actividad basal del eje hipotálamo - hipófisis - adrenal presentando, paradójicamente, los animales menos ansiosos mayores niveles basales de corticosterona circulante.
2. Dichas diferencias individuales en los niveles de ansiedad han resultado ser estables y constantes en el tiempo incluso después de haber sometido a los animales a un estrés crónico e impredecible, lo que sugiere que los animales muestran un 'rasgo' de ansiedad. Esta característica interindividual está relacionada con la diferente actividad del eje hipotálamo - hipófisis - adrenal encontrada en cada grupo.
3. Los animales con niveles elevados de ansiedad presentaron un déficit en el aprendizaje de distintas tareas como el laberinto acuático de Morris, así como en la fuerza con la que establece una memoria emocional en el condicionamiento del miedo al tono, pero no al contexto. El análisis exhaustivo de las causas por las que los animales más ansiosos condicionaron menos al tono indica que la corticosterona no está implicada en dicho efecto.
4. El paradigma de estrés crónico impredecible alteró la memoria de reconocimiento de objetos, la memoria de localización de objetos y la alternancia espontánea en los animales, incluso cuando fueron evaluados mucho tiempo después de haber concluido el estrés.
5. Los animales más ansiosos han resultado ser los más vulnerables al efecto nocivo tanto del estrés como del envejecimiento, mostrando tener sus capacidades cognitivas alteradas con respecto a los otros dos grupos de ansiedad en diversas pruebas de memoria.

Conclusiones

6. Tanto el estrés crónico impredecible como el proceso de envejecimiento han modulado la expresión bioquímica de diversos factores en el cerebro de los animales. El protocolo de estrés alteró la expresión de PSA-NCAM, del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y del receptor de glucocorticoides; mientras que el envejecimiento moduló la expresión de FGF y su receptor, NCAM y su forma polisializada y de los receptores de glucocorticoides.
7. En comparación con los animales mas ansiosos, los animales con rasgo de ansiedad bajo, los LA, mostraron una mayor expresión de receptores de glucocorticoides hipocampales y de NCAM en corteza frontal, y niveles más bajos del receptor de FGF de tipo 1 en el hipocampo.
8. El tratamiento con FGL favoreció el aprendizaje espacial de los animales jóvenes evaluado en el laberinto acuático de Morris e indujo un incremento en la densidad de las espinas dendríticas basales del área CA1 del hipocampo.
9. El estrés crónico en la edad adulta, 12 meses de edad, produjo un déficit de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris durante el envejecimiento, a los 18 meses de edad. Este déficit ocurrió en paralelo a un descenso en la tasa de supervivencia de células BrdU positivas en el giro dentado del hipocampo, así como del número de neuronas granulares. Además, existe una correlación positiva entre el número de células BrdU positivas en el giro del hipocampo y la memoria espacial, siendo las ratas que mejor ejecutan la prueba, las que presentan una mayor tasa de supervivencia neuronal
10. La administración crónica de FGL durante un protocolo de estrés crónico e impredecible, previno el déficit de memoria espacial observado durante el envejecimiento, así como el descenso en la tasa de supervivencia de nuevas neuronas.

VII. Bibliografía

- Abelson, J.L., Glitz, D., Cameron, O.G., Lee, M.A., Bronzo, M., y Curtis, G.C. (1991). Blunted growth hormone response to clonidine in patients with generalized anxiety disorder. *Arch.Gen.Psychiatry* 48, 157-162.
- Abou-Samra, A.B., Harwood, J.P., Catt, K.J., y Aguilera, G. (1987). Mechanisms of action of CRF and other regulators of ACTH release in pituitary corticotrophs. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 512, 67-84.
- Abraham, J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz, D., y Fiddes, J.C. (1986). Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233, 545-548.
- Abrous, D.N., Montaron, M.F., Petry, K.G., Rougon, G., Darnaudery, M., Le Moal, M., y Mayo, W. (1997). Decrease in highly polysialylated neuronal cell adhesion molecules and in spatial learning during ageing are not correlated. *Brain research* 744, 285-292.
- Adamec, R. y Young, B. (2000). Neuroplasticity in specific limbic system circuits may mediate specific kindling induced changes in animal affect-implications for understanding anxiety associated with epilepsy. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 24, 705-723.
- Adell, A., Casanovas, J.M., y Artigas, F. (1997). Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology* 36, 735-741.
- Adolphs, R. (2001). The neurobiology of social cognition. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11, 231-239.
- Adolphs, R. (2002). Neural systems for recognizing emotion. *Curr.Opin.Neurobiol.* 12, 169-177.
- Aggleton, J.P., Keen, S., Warburton, E.C., y Bussey, T.J. (1997). Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Res.Bull.* 43, 279-287.
- Aggleton, J.P., Neave, N., Nagle, S., y Hunt, P.R. (1995). A comparison of the effects of anterior thalamic, mamillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. *Behav.Brain Res.* 68, 91-101.
- Aguilera, G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol.* 15, 321-350.
- Ahi, J., Radulovic, J., y Spiess, J. (2004). The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behav.Brain Res.* 149, 17-31.
- Ahima, R.S. y Harlan, R.E. (1990). Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* 39, 579-604.
- Akirav, I., Sandi, C., y Richter-Levin, G. (2001). Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. *European journal of neuroscience* 14, 719-725.
- Akirav, I. y Richter-Levin, G. (1999). Priming stimulation in the basolateral amygdala modulates synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *Neuroscience Letters* 270, 83-86.
- Akirav, I. y Richter-Levin, G. (2002). Mechanisms of Amygdala Modulation of Hippocampal Plasticity. *J.Neurosci.* 22, 9912-9921.
- Alexinsky, T., Przybyslawski, J., Mileusnic, R., Rose, S.P., y Sara, S.J. (1997). Antibody to day-old chick brain glycoprotein produces amnesia in adult rats. *Neurobiol.Learn.Mem.* 67, 14-20.
- Alfonso, J., Frick, L.R., Silberman, D.M., Palumbo, M.L., Genaro, A.M., y Frasch, A.C. (2006). Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol.Psychiatry* 59, 244-251.
- Allen, J.P. y Allen, C.F. (1974). Role of the amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat.

Neuroendocrinology 15, 220-230.

- Alloway,T.M. y Routtenberg,A. (1967). "Reminiscence" in the cold flour beetle (*Tenebrio molitor*). *Science* 158, 1066-1067.
- Almeida,O.F., Conde,G.L., Crochemore,C., Demeneix,B.A., Fischer,D., Hassan,A.H., Meyer,M., Holsboer,F., y Michaelidis,T.M. (2000). Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J.* 14, 779-790.
- Amaral,D.G. (2002). The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: implications for understanding social anxiety. *Biol.Psychiatry* 51, 11-17.
- Amat,J., Baratta,M.V., Paul,E., Bland,S.T., Watkins,L.R., y Maier,S.F. (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat.Neurosci.* 8, 365-371.
- Amat,J., Matus-Amat,P., Watkins,L.R., y Maier,S.F. (1998a). Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res.* 812, 113-120.
- Amat,J., Matus-Amat,P., Watkins,L.R., y Maier,S.F. (1998b). Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Res.* 797, 12-22.
- Ambrogio Lorenzini,C.G., Baldi,E., Bucherelli,C., Sacchetti,B., y Tassoni,G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol.Learn.Mem.* 71, 1-18.
- Anagnostaras,S.G., Gale,G.D., y Fanselow,M.S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8-17.
- Anand,A. y Shekhar,A. (2003). Brain imaging studies in mood and anxiety disorders: special emphasis on the amygdala. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 985, 370-388.
- Anderson,A.K. y Phelps,E.A. (2002). Is the human amygdala critical for the subjective experience of emotion? Evidence of intact dispositional affect in patients with amygdala lesions. *J.Cogn Neurosci.* 14, 709-720.
- Andreatini,R. y Bacellar,L.F. (2000). Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 24, 549-560.
- Andreis,P.G., Neri,G., Mazzocchi,G., Musajo,F., y Nussdorfer,G.G. (1992). Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex: the involvement of the zona medullaris. *Endocrinology* 131, 69-72.
- Antoni,F.A. (1993). Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol.* 14, 76-122.
- Arborelius,L., Owens,M.J., Plotsky,P.M., y Nemeroff,C.B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J.Endocrinol.* 160, 1-12.
- Armario,A., Lopez-Calderon,A., Jolin,T., y Balasch,J. (1986). Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci Biobehav.Rev.* 10, 245-250.
- Armario,A., Marti,J., y Gil,M. (1990). The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 15, 341-347.
- Armario,A., Marti,O., Molina,T., de Pablo,J., y Valdes,M. (1996). Acute stress markers in humans: response of plasma glucose, cortisol and prolactin to two examinations differing in the anxiety they provoke. *Psychoneuroendocrinology* 21, 17-24.
- Armario,A., Valles,A., Dal Zotto,S., Marquez,C., y Belda,X. (2004). A single exposure to severe stressors causes long-term desensitisation of the physiological response to the homotypic stressor. *Stress.* 7, 157-172.

Bibliografía

- Arnsten, A.F. y Goldman-Rakic, P.S. (1998). Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys: evidence for a hyperdopaminergic mechanism. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 362-368.
- Aronsson, M., Fuxe, K., Dong, Y., Agnati, L.F., Okret, S., y Gustafsson, J.A. (1988). Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85, 9331-9335.
- Arriza, J.L., Simerly, R.B., Swanson, L.W., y Evans, R.M. (1988). The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* 1, 887-900.
- Aston-Jones, G., Chiang, C., y Alexinsky, T. (1991). Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Prog. Brain Res.* 88, 501-520.
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., Kubiak, P., Valentino, R.J., y Shipley, M.T. (1996). Role of the locus coeruleus in emotional activation. *Prog. Brain Res.* 107, 379-402.
- Avgustinovich, D.F., Lipina, T.V., Bondar, N.P., Alekseyenko, O.V., y Kudryavtseva, N.N. (2000). Features of the genetically defined anxiety in mice. *Behav. Genet.* 30, 101-109.
- Axelrod, J. (1959). Metabolism of epinephrine and other sympathomimetic amines. *Physiol Rev.* 39, 751-776.
- Bach, M.E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y.F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D., y Kandel, E.R. (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 5280-5285.
- Bain, M.J., Dwyer, S.M., y Rusak, B. (2004). Restraint stress affects hippocampal cell proliferation differently in rats and mice. *Neurosci Lett.* 368, 7-10.
- Baker, K.B. y Kim, J.J. (2002). Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn. Mem.* 9, 58-65.
- Bale, T.L., Giordano, F.J., Hickey, R.P., Huang, Y., Nath, A.K., Peterson, K.L., Vale, W.W., y Lee, K.F. (2002). Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 7734-7739.
- Balogh, S.A. y Wehner, J.M. (2003). Inbred mouse strain differences in the establishment of long-term fear memory. *Behav. Brain Res.* 140, 97-106.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M., y Chrousos, G.P. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 17, 245-261.
- Bardgett, M.E., Taylor, G.T., Csemansky, J.G., Newcomer, J.W., y Nock, B. (1994). Chronic corticosterone treatment impairs spontaneous alternation behavior in rats. *Behav. Neural Biol.* 61, 186-190.
- Bardo, M.T., Donohew, R.L., y Harrington, N.G. (1996). Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav. Brain Res.* 77, 23-43.
- Barker, G.R., Bird, F., Alexander, V., y Warburton, E.C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J. Neurosci.* 27, 2948-2957.
- Barnes, C. (1993). Electrophysiological changes in hippocampus of aged rodents: predictions for functional change in aged primate. *Neurobiol. Aging* 14, 645-646.
- Bartolomucci, A., de Biurrun, G., Czeh, B., van Kampen, M., y Fuchs, E. (2002). SHORT COMMUNICATION Selective enhancement of spatial learning under chronic psychosocial stress. *Eur J Neurosci* 15, 1863-1866.
- Bats, S., Thoumas, J.L., Lordi, B., Tonon, M.C., Lalonde, R., y Caston, J. (2001). The effects of a mild stressor on spontaneous alternation in mice. *Behav. Brain Res.* 118, 11-15.

- Baxter,M.G. y Murray,E.A. (2002). The amygdala and reward. *Nat.Rev.Neurosci.* 3, 563-573.
- Beaulieu,S., Di Paolo,T., y Barden,N. (1986). Control of ACTH secretion by the central nucleus of the amygdala: implication of the serotonergic system and its relevance to the glucocorticoid delayed negative feedback mechanism. *Neuroendocrinology* 44, 247-254.
- Beck,K.D. y Luine,V.N. (1999). Food deprivation modulates chronic stress effects on object recognition in male rats: role of monoamines and amino acids. *Brain Res.* 830, 56-71.
- Beck,K.D. y Luine,V.N. (2002). Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions. *Physiol Behav.* 75, 661-673.
- Becker,C.G., Artola,A., Gerardy-Schahn,R., Becker,T., Welzl,H., y Schachner,M. (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *Journal of neuroscience research* 45, 143-152.
- Beggs,H.E., Soriano,P., y Maness,P.F. (1994). NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J.Cell Biol.* 127, 825-833.
- Beiko,J., Lander,R., Hampson,E., Boon,F., y Cain,D.P. (2004). Contribution of sex differences in the acute stress response to sex differences in water maze performance in the rat. *Behav.Brain Res.* 151, 239-253.
- Belluardo,N., Mudo,G., Blum,M., Itoh,N., Agnati,L., y Fuxe,K. (2004). Nicotine-induced FGF-2 mRNA in rat brain is preserved during aging. *Neurobiol.Aging* 25, 1333-1342.
- Benson,D.L., Schnapp,L.M., Shapiro,L., y Huntley,G.W. (2000). Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol.* 10, 473-482.
- Benton,D. y Nabb,S. (2003). Carbohydrate, memory, and mood. *Nutr.Rev.* 61, S61-S67.
- Berger,S., Wolfer,D.P., Selbach,O., Alter,H., Erdmann,G., Reichardt,H.M., Chepkova,A.N., Welzl,H., Haas,H.L., Lipp,H.P., y Schutz,G. (2006). Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 195-200.
- Berridge,C.W., Arnsten,A.F., y Foote,S.L. (1993). Noradrenergic modulation of cognitive function: clinical implications of anatomical, electrophysiological and behavioural studies in animal models. *Psychol.Med.* 23, 557-564.
- Berridge,C.W. y Dunn,A.J. (1989). CRF and restraint-stress decrease exploratory behavior in hypophysectomized mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 34, 517-519.
- Berridge,C.W. y Waterhouse,B.D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 42, 33-84.
- Berton,O., Aguerre,S., Sarrieau,A., Mormede,P., y Chaouloff,F. (1998). Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 82, 147-159.
- Bhatnagar,S. y Dallman,M. (1998). Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 84, 1025-1039.
- Biebl,M., Cooper,C.M., Winkler,J., y Kuhn,H.G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 291, 17-20.
- Bielsky,I.F., Hu,S.B., Szegda,K.L., Westphal,H., y Young,L.J. (2004). Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 29, 483-493.
- Bitran,D., Shiekh,M., Dowd,J.A., Dugan,M.M., y Renda,P. (1998). Corticosterone is permissive to the anxiolytic effect

that results from the blockade of hippocampal mineralocorticoid receptors. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 60, 879-887.

Bizon,J.L. y Gallagher,M. (2003). Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur.J Neurosci* 18, 215-219.

Bizon,J.L., Helm,K.A., Han,J.S., Chun,H.J., Pucilowska,J., Lund,P.K., y Gallagher,M. (2001). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur.J Neurosci* 14, 1739-1751.

Blake,T.M., Varnhagen,C.K., y Parent,M.B. (2001). Emotionally arousing pictures increase blood glucose levels and enhance recall. *Neurobiol.Learn.Mem.* 75, 262-273.

Blanchard,C., Blanchard,R., Fellous,J.M., Guimaraes,F.S., Irwin,W., LeDoux,J.E., McGaugh,J.L., Rosen,J.B., Schenberg,L.C., Volchan,E., y da Cunha,C. (2001a). The brain decade in debate: III. Neurobiology of emotion. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 34, 283-293.

Blanchard,D.C., Griebel,G., y Blanchard,R.J. (2001b). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 25, 205-218.

Blanchard,R.J., Nikulina,J.N., Sakai,R.R., McKittrick,C., McEwen,B., y Blanchard,D.C. (1998). Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol Behav.* 63, 561-569.

Bland,S.T., Tamlyn,J.P., Barrientos,R.M., Greenwood,B.N., Watkins,L.R., Campeau,S., Day,H.E., y Maier,S.F. (2007). Expression of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor mRNA in the medial prefrontal cortex and hippocampus after uncontrollable or controllable stress. *Neuroscience* 144, 1219-1228.

Bliss,T.V. y Lomo,T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J.Physiol* 232, 331-356.

Blundell,P., Hall,G., y Killcross,S. (2003). Preserved sensitivity to outcome value after lesions of the basolateral amygdala. *J.Neurosci.* 23, 7702-7709.

Boadle-Biber,M.C., Corley,K.C., Graves,L., Phan,T.H., y Rosecrans,J. (1989). Increase in the activity of tryptophan hydroxylase from cortex and midbrain of male Fischer 344 rats in response to acute or repeated sound stress. *Brain Res.* 482, 306-316.

Bock,E., Edvardsen,K., Gibson,A., Linnemann,D., Lyles,J.M., y Nybroe,O. (1987). Characterization of soluble forms of NCAM. *FEBS Lett.* 225, 33-36.

Bodnoff,S.R., Humphreys,A.G., Lehman,J.C., Diamond,D.M., Rose,G.M., y Meaney,M.J. (1995). Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* 15, 61-69.

Boehm,S.L., Ponomarev,I., Jennings,A.W., Whiting,P.J., Rosahl,T.W., Garrett,E.M., Blednov,Y.A., y Harris,R.A. (2004). gamma-Aminobutyric acid A receptor subunit mutant mice: new perspectives on alcohol actions. *Biochem.Pharmacol.* 68, 1581-1602.

Bontempi,B., Laurent-Demir,C., Destrade,C., y Jaffard,R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *La Nature* 400, 671-675.

Borcel,E., Perez-Alvarez,L., Herrero,A.I., Brionne,T., Varea,E., Berezin,V., Bock,E., Sandi,C., y Venero,C. (2008). Chronic stress in adulthood followed by intermittent stress impairs spatial memory and the survival of newborn hippocampal cells in aging animals: prevention by FGL, a peptide mimetic of neural cell adhesion molecule. *Behav.Pharmacol.* 19, 41-49.

Borkovec,T.D. y Roemer,L. (1995). Perceived functions of worry among generalized anxiety disorder subjects: distraction from more emotionally distressing topics? *J Behav.Ther.Exp.Psychiatry* 26, 25-30.

Bibliografía

- Bornstein, S.R. y Chrousos, G.P. (1999). Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84, 1729-1736.
- Borrell, J., de Kloet, E.R., Versteeg, D.H., y Bohus, B. (1983). Inhibitory avoidance deficit following short-term adrenalectomy in the rat: the role of adrenal catecholamines. *Behav.Neural Biol.* 39, 241-258.
- Borta, A. y Schwarting, R.K. (2005). Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiol Behav.* 84, 387-396.
- Bosch, O.J., Meddle, S.L., Beiderbeck, D.I., Douglas, A.J., y Neumann, I.D. (2005). Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. *J.Neurosci.* 25, 6807-6815.
- Bowman, R.E., Beck, K.D., y Luine, V.N. (2003). Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm.Behav.* 43, 48-59.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
- Brambilla, F., Marini, S., Saito, A., Fassone, G., Picardi, A., Nerozzi, D., y Pancheri, P. (1994). Noradrenergic and dopaminergic interrelation in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 53, 231-242.
- Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G., y Soares, J.C. (2003b). GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol.Psychiatry* 8, 721-37, 715.
- Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G., y Soares, J.C. (2003a). GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol.Psychiatry* 8, 721-37, 715.
- Brandeis, R., Brandys, Y., y Yehuda, S. (1989). The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int.J.Neurosci.* 48, 29-69.
- Brann, D.W. y Mahesh, V.B. (1995). Glutamate: a major neuroendocrine excitatory signal mediating steroid effects on gonadotropin secretion. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 53, 325-329.
- Brewerton, T.D. (1995). Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20, 561-590.
- Brinks, V., de Kloet, E.R., y Oitzl, M.S. (2007a). Strain specific fear behaviour and glucocorticoid response to aversive events: modelling PTSD in mice. *Prog.Brain Res.* 167, 257-261.
- Brinks, V., van der Mark, M.H., de Kloet, E.R., y Oitzl, M.S. (2007b). Differential MR/GR activation in mice results in emotional states beneficial or impairing for cognition. *Neural Plast.* 90163.
- Brown, C.P. (1976). Two types of habituation in chicks: differential dependence on cholinergic activity. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 4, 235-238.
- Brummendorf, T. y Rathjen, F.G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6, 584-593.
- Buchanan, T.W. y Lovallo, W.R. (2001). Enhanced memory for emotional material following stress-level cortisol treatment in humans. *Psychoneuroendocrinology* 26, 307-317.
- Buhl, E.H. y Schlote, W. (1987). Intracellular lucifer yellow staining and electron microscopy of neurones in slices of fixed epitumorous human cortical tissue. *Acta Neuropathol.* 75, 140-146.
- Burchfield, S.R., Woods, S.C., y Elich, M.S. (1980). Pituitary adrenocortical response to chronic intermittent stress. *Physiol Behav.* 24, 297-302.
- Bumstein, K.L. y Cidlowski, J.A. (1992). The down side of glucocorticoid receptor regulation. *Mol.Cell Endocrinol.* 83, C1-

C8.

- Bussey, T.J., Duck, J., Muir, J.L., y Aggleton, J.P. (2000). Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behav. Brain Res.* 111, 187-202.
- Butler, P.D., Weiss, J.M., Stout, J.C., y Nemeroff, C.B. (1990). Corticotropin-releasing factor produces fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. *J. Neurosci.* 10, 176-183.
- Buwalda, B., Kole, M.H., Veenema, A.H., Huininga, M., De Boer, S.F., Korte, S.M., y Koolhaas, J.M. (2005). Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 83-97.
- Cahill, L. y Alkire, M.T. (2003). Epinephrine enhancement of human memory consolidation: interaction with arousal at encoding. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79, 194-198.
- Cahill, L. y McGaugh, J.L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in neurosciences* 21, 294-299.
- Calamandrei, G. y Alleva, E. (1995). Neuronal growth factors, neurotrophins and memory deficiency. *Behav. Brain Res.* 66, 129-132.
- Cambon, K., Venero, C., Berezin, V., Bock, E., y Sandi, C. (2003). Post-training administration of a synthetic peptide ligand of the neural cell adhesion molecule, C3d, attenuates long-term expression of contextual fear conditioning. *Neuroscience* 122, 183-191.
- Cambon, K., Hansen, S.M., Venero, C., Herrero, A.I., Skibo, G., Berezin, V., Bock, E., y Sandi, C. (2004). A Synthetic Neural Cell Adhesion Molecule Mimetic Peptide Promotes Synaptogenesis, Enhances Presynaptic Function, and Facilitates Memory Consolidation. *J. Neurosci.* 24, 4197-4204.
- Cameron, H.A. y Gould, E. (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61, 203-209.
- Cameron, H.A. y Gould, E. (1996). Distinct populations of cells in the adult dentate gyrus undergo mitosis or apoptosis in response to adrenalectomy. *J Comp Neurol.* 369, 56-63.
- Cameron, H.A. y McKay, R.D. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat. Neurosci* 2, 894-897.
- Cameron, H.A., Tanapat, P., y Gould, E. (1998). Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 82, 349-354.
- Campeau, S. y Davis, M. (1995). Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J. Neurosci.* 15, 2301-2311.
- Cannistraro, P.A. y Rauch, S.L. (2003). Neural circuitry of anxiety: evidence from structural and functional neuroimaging studies. *Psychopharmacol. Bull.* 37, 8-25.
- Cannon, W.B. Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews* , 399-421. 1929.
- Carrasco, G.A. y Van de Kar, L.D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 235-272.
- Carter, R.N., Pinnock, S.B., y Herbert, J. (2004). Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress? *Neuroscience* 126, 9-19.
- Casolini, P., Cigliana, G., Alema, G.S., Ruggieri, V., Angelucci, L., y Catalani, A. (1997). Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life. *Neuroscience* 79, 1005-1012.

- Cassens,G., Kuruc,A., Roffman,M., Orsulak,P.J., y Schildkraut,J.J. (1981). Alterations in brain norepinephrine metabolism and behavior induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Behav.Brain Res.* 2, 387-407.
- Catalani,A., Casolini,P., Cigliana,G., Scaccianoce,S., Consoli,C., Cinque,C., Zuen,A.R., y Angelucci,L. (2002). Maternal corticosterone influences behavior, stress response and corticosteroid receptors in the female rat. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 73, 105-114.
- Catalani,A., Casolini,P., Scaccianoce,S., Patacchioli,F.R., Spinozzi,P., y Angelucci,L. (2000). Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny. *Neuroscience* 100, 319-325.
- Chadi,G., Rosen,L., Cintra,A., Tinner,B., Zoli,M., Pettersson,R.F., y Fuxe,K. (1993). Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. *Neuroreport* 4, 783-786.
- Chan,C.K. y Lovibond,P.F. (1996). Expectancy bias in trait anxiety. *Journal of abnormal psychology* 105, 637-647.
- Chao,H.M. y McEwen,B.S. (1994). Glucocorticoids and the expression of mRNAs for neurotrophins, their receptors and GAP-43 in the rat hippocampus. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 26, 271-276.
- Chaouloff,F. (1995). Regulation of 5-HT receptors by corticosteroids: where do we stand? *Fundam.Clin.Pharmacol.* 9, 219-233.
- Charney,D.S. y Heninger,G.R. (1986). Abnormal regulation of noradrenergic function in panic disorders. Effects of clonidine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Arch.Gen.Psychiatry* 43, 1042-1054.
- Charney,D.S., Woods,S.W., Nagy,L.M., Southwick,S.M., Krystal,J.H., y Heninger,G.R. (1990). Noradrenergic function in panic disorder. *J.Clin.Psychiatry* 51 *Suppl A*, 5-11.
- Cheetham,S.C., Crompton,M.R., Katona,C.L., y Horton,R.W. (1990). Brain 5-HT₁ binding sites in depressed suicides. *Psychopharmacology (Berl)* 102, 544-548.
- Chen,C. y Tonegawa,S. (1997). Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu.Rev.Neurosci.* 20, 157-184.
- Chen,J.X., Tang,Y.T., y Yang,J.X. (2007). Changes of Glucocorticoid Receptor and Levels of CRF mRNA, POMC mRNA in Brain of Chronic Immobilization Stress Rats. *Cell Mol.Neurobiol.*
- Chen,Y.Z., Hua,S.Y., Wang,C.A., Wu,L.G., Gu,Q., y Xing,B.R. (1991). An electrophysiological study on the membrane receptor-mediated action of glucocorticoids in mammalian neurons. *Neuroendocrinology* 53 *Suppl 1*, 25-30.
- Chhatwal,J.P. y Ressler,K.J. (2007). Modulation of fear and anxiety by the endogenous cannabinoid system. *CNS.Spectr.* 12, 211-220.
- Christie,B.R. y Cameron,H.A. (2006). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 16, 199-207.
- Chrousos,G.P. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 851, 311-335.
- Chrousos,G.P. y Gold,P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267, 1244-1252.
- Clark,R.E., Zola,S.M., y Squire,L.R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J.Neurosci.* 20, 8853-8860.
- Clody,D.E. y Carlton,P.L. (1969). Behavioral effects of lesions of the medial septum of rats. *J.Comp Physiol Psychol.* 67, 344-351.

Bibliografía

- Clugnet, M.C. y LeDoux, J.E. (1990). Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *J Neurosci* 10, 2818-2824.
- Coccaro, E.F., Lawrence, T., Trestman, R., Gabriel, S., Klar, H.M., y Siever, L.J. (1991). Growth hormone responses to intravenous clonidine challenge correlate with behavioral irritability in psychiatric patients and healthy volunteers. *Psychiatry Res.* 39, 129-139.
- Cole, B.J. y Robbins, T.W. (1992). Forebrain norepinephrine: role in controlled information processing in the rat. *Neuropsychopharmacology* 7, 129-142.
- Cole, M.A., Kim, P.J., Kalman, B.A., y Spencer, R.L. (2000). Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. *Psychoneuroendocrinology* 25, 151-167.
- Commissaris, R.L., Harrington, G.M., y Altman, H.J. (1990). Benzodiazepine anti-conflict effects in Maudsley reactive (MR/Har) and non-reactive (MNRA/Har) rats. *Psychopharmacology (Berl)* 100, 287-292.
- Conrad, C.D., Galea, L.A., Kuroda, Y., y McEwen, B.S. (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav. Neurosci* 110, 1321-1334.
- Conrad, C.D., LeDoux, J.E., Magarinos, A.M., y McEwen, B.S. (1999a). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav. Neurosci.* 113, 902-913.
- Conrad, C.D., Lupien, S.J., y McEwen, B.S. (1999b). Support for a bimodal role for type II adrenal steroid receptors in spatial memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 72, 39-46.
- Cook, S.C. y Wellman, C.L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurobiol.* 60, 236-248.
- Coplan, J.D. y Lydiard, R.B. (1998). Brain circuits in panic disorder. *Biol. Psychiatry* 44, 1264-1276.
- Cordero, M.I., Merino, J.J., y Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral neuroscience* 112, 885-891.
- Cordero, M.I., Rodríguez, J.J., Davies, H.A., Peddie, C.J., Sandi, C., y Stewart, M.G. (2005). Chronic restraint stress down-regulates amygdaloid expression of polysialylated neural cell adhesion molecule. *Neuroscience* 133, 903-910.
- Cordero, M.I., Krut, N.D., Merino, J.J., y Sandi, C. (2002). Glucocorticoid involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. *Stress : the international journal on the biology of stress* 5, 73-79.
- Cordero, M.I. y Sandi, C. (1998). A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: Dependence upon training intensity. *Brain research* 786, 11-17.
- Corodimas, K.P., LeDoux, J.E., Gold, P.W., y Schulkin, J. (1994). Corticosterone potentiation of conditioned fear in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 746, 392-393.
- Coste, S.C., Kesterson, R.A., Heldwein, K.A., Stevens, S.L., Heard, A.D., Hollis, J.H., Murray, S.E., Hill, J.K., Pantely, G.A., Hohimer, A.R., Hatton, D.C., Phillips, T.J., Finn, D.A., Low, M.J., Rittenberg, M.B., Stenzel, P., y Stenzel-Poore, M.P. (2000). Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet.* 24, 403-409.
- Coussens, C.M. y Teyler, T.J. (1996). Protein kinase and phosphatase activity regulate the form of synaptic plasticity expressed. *Synapse* 24, 97-103.
- Crawley, J.N., Olschowka, J.A., Diz, D.I., y Jacobowitz, D.M. (1985). Behavioral investigation of the coexistence of substance P, corticotropin releasing factor, and acetylcholinesterase in lateral dorsal tegmental neurons projecting to the medial frontal cortex of the rat. *Peptides* 6, 891-901.

- Cremer,H., Chazal,G., Carleton,A., Goridis,C., Vincent,J.D., y Lledo,P.M. (1998). Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 13242-13247.
- Cremer,H., Lange,R., Christoph,A., Plomann,M., Vopper,G., Roes,J., Brown,R., Baldwin,S., Kraemer,P., Scheff,S., y . (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455-459.
- Cullinan,W.E., Herman,J.P., Battaglia,D.F., Akil,H., y Watson,S.J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64, 477-505.
- Cunningham,B.A., Hemperly,J.J., Murray,B.A., Prediger,E.A., Brackenbury,R., y Edelman,G.M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236, 799-806.
- Cushman,P., Jr. y Kreek,M.J. (1974). Methadone-maintained patients. Effect of methadone on plasma testosterone, FSH, LH, and prolactin. *N.Y.State J.Med.* 74, 1970-1973.
- Czeh,B., Michaelis,T., Watanabe,T., Frahm,J., de Biurrun,G., van Kampen,M., Bartolomucci,A., y Fuchs,E. (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 12796-12801.
- D'Aquila,P.S., Brain,P., y Willner,P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav.* 56, 861-867.
- D'Hooge,R. y De Deyn,P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 36, 60-90.
- Dai,H., Krost,M., y Carey,R.J. (1995). A new methodological approach to the study of habituation: the use of positive and negative behavioral indices of habituation. *J.Neurosci.Methods* 62, 169-174.
- Dal Zotto,S., Marti,O., y Amario,A. (2002). Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors. *Behav.Brain Res.* 129, 187-195.
- Dalley,J.W., Theobald,D.E., Pereira,E.A., Li,P.M., y Robbins,T.W. (2002). Specific abnormalities in serotonin release in the prefrontal cortex of isolation-reared rats measured during behavioural performance of a task assessing visuospatial attention and impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)* 164, 329-340.
- Dalvi,A. y Rodgers,R.J. (1996). GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 128, 380-397.
- Daston,M.M., Bastmeyer,M., Rutishauser,U., y O'Leary,D.D. (1996). Spatially restricted increase in polysialic acid enhances corticospinal axon branching related to target recognition and innervation. *J.Neurosci.* 16, 5488-5497.
- Davis,L.L., Suris,A., Lambert,M.T., Heimberg,C., y Petty,F. (1997). Post-traumatic stress disorder and serotonin: new directions for research and treatment. *J.Psychiatry Neurosci.* 22, 318-326.
- Davis,M. (1992a). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu.Rev.Neurosci* 15, 353-375.
- Davis,M. (1992b). The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol.Sci.* 13, 35-41.
- Davis,M. (1998). Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol.Psychiatry* 44, 1239-1247.
- Davis,M. y Myers,K.M. (2002). The role of glutamate and gamma-aminobutyric acid in fear extinction: clinical implications for exposure therapy. *Biol.Psychiatry* 52, 998-1007.

- Dayas,C.V. y Day,T.A. (2002). Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. *Eur.J.Neurosci.* 15, 1712-1718.
- De Boer,S.F., Slangen,J.L., y van der,G.J. (1990). Effects of chlordiazepoxide and buspirone on plasma catecholamine and corticosterone levels in rats under basal and stress conditions. *Endocrinol.Exp.* 24, 229-239.
- de Kloet,E.R., Van Acker,S.A., Sibug,R.M., Oitzl,M.S., Meijer,O.C., Rahmouni,K., y de Jong,W. (2000). Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int.* 57, 1329-1336.
- de Kloet,E.R., Vreugdenhil,E., Oitzl,M.S., y Joels,M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr.Rev.* 19, 269-301.
- de Kloet,E.R., Oitzl,M.S., y Joels,M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in neurosciences* 22, 422-426.
- De la Fuente,M., Hernanz,A., Medina,S., Guayerbas,N., Fernandez,B., y Viveros,M.P. (2003). Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely ageing mice. *Neurochem.Int.* 43, 165-172.
- de Quervain,D.J., Henke,K., Aerni,A., Coluccia,D., Wollmer,M.A., Hock,C., Nitsch,R.M., y Papassotiropoulos,A. (2003a). A functional genetic variation of the 5-HT2a receptor affects human memory. *Nat.Neurosci* 6, 1141-1142.
- de Quervain,D.J., Henke,K., Aerni,A., Treyer,V., McGaugh,J.L., Berthold,T., Nitsch,R.M., Buck,A., Roozendaal,B., y Hock,C. (2003b). Glucocorticoid-induced impairment of declarative memory retrieval is associated with reduced blood flow in the medial temporal lobe. *Eur.J.Neurosci.* 17, 1296-1302.
- de Quervain,D.J., Roozendaal,B., y McGaugh,J.L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.
- de Quervain,D.J., Roozendaal,B., Nitsch,R.M., McGaugh,J.L., y Hock,C. (2000). Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nat.Neurosci.* 3, 313-314.
- De Roo,M., Klauser,P., Mendez,P., Poglia,L., y Muller,D. (2008). Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb.Cortex* 18, 151-161.
- Deak,T., Nguyen,K.T., Ehrlich,A.L., Watkins,L.R., Spencer,R.L., Maier,S.F., Licinio,J., Wong,M.L., Chrousos,G.P., Webster,E., y Gold,P.W. (1999). The impact of the nonpeptide corticotropin-releasing hormone antagonist antalarmin on behavioral and endocrine responses to stress. *Endocrinology* 140, 79-86.
- Del Arco,A., Segovia,G., Garrido,P., de Blas,M., y Mora,F. (2007). Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav.Brain Res.* 176, 267-273.
- Del Olmo,N., Higuera-Matas,A., Miguens,M., Garcia-Lecumberri,C., y Ambrosio,E. (2007). Cocaine self-administration improves performance in a highly demanding water maze task. *Psychopharmacology (Berl)* 195, 19-25.
- Delatour,B. y Gisquet-Verrier,P. (1996). Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. *Behav.Neurosci.* 110, 1282-1298.
- Dember,W.N. y Fowler,H. (1958). Spontaneous alternation behavior. *Psychol.Bull.* 55, 412-428.
- Dere,E., Huston,J.P., y Souza Silva,M.A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 31, 673-704.
- Devauges,V. y Sara,S.J. (1990). Activation of the noradrenergic system facilitates an attentional shift in the rat. *Behav.Brain Res.* 39, 19-28.
- Diamond,D.M., Bennett,M.C., Fleshner,M., y Rose,G.M. (1992). Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus* 2, 421-430.

- Diamond,D.M., Park,C.R., Heman,K.L., y Rose,G.M. (1999). Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. *Hippocampus* 9, 542-552.
- Dingemanse,N.J., Both,C., Drent,P.J., y Tinbergen,J.M. (2004). Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. *Proc.Biol.Sci.* 271, 847-852.
- Diorio,D., Viau,V., y Meaney,M.J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J.Neurosci.* 13, 3839-3847.
- Dityatev,A., Dityateva,G., y Schachner,M. (2000). Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron* 26, 207-217.
- Dityatev,A., Dityateva,G., Sytnyk,V., Dellling,M., Toni,N., Nikonenko,I., Muller,D., y Schachner,M. (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *J.Neurosci.* 24, 9372-9382.
- Divac,I. (1975). Magnocellular nuclei of the basal forebrain project to neocortex, brain stem, and olfactory bulb. Review of some functional correlates. *Brain Res.* 93, 385-398.
- Dix,S.L. y Aggleton,J.P. (1999). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav.Brain Res.* 99, 191-200.
- Doherty,P. y Walsh,F.S. (1996). CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol.Cell Neurosci.* 8, 99-111.
- Dong,H., Goico,B., Martin,M., Csernansky,C.A., Bertchume,A., y Csernansky,J.G. (2004). Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience* 127, 601-609.
- Donohue,H.S., Gabbott,P.L., Davies,H.A., Rodriguez,J.J., Cordero,M.I., Sandi,C., Medvedev,N.I., Popov,V.I., Colyer,F.M., Peddie,C.J., y Stewart,M.G. (2006). Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study. *Neuroscience* 140, 597-606.
- Doyle,E., Nolan,P.M., Bell,R., y Regan,C.M. (1992a). Hippocampal NCAM180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat. *J.Neurosci.Res.* 31, 513-523.
- Doyle,E., Nolan,P.M., Bell,R., y Regan,C.M. (1992b). Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat. *Journal of neurochemistry* 59, 1570-1573.
- Doyle,E. y Regan,C.M. (1993). Cholinergic and dopaminergic agents which inhibit a passive avoidance response attenuate the paradigm-specific increases in NCAM sialylation state. *J.Neural Transm.Gen.Sect.* 92, 33-49.
- Drapeau,E., Mayo,W., Aurousseau,C., Le Moal,M., Piazza,P.-V., y Abrous,D.N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14385-14390.
- Drevets,W.C., Thase,M.E., Moses-Kolko,E.L., Price,J., Frank,E., Kupfer,D.J., y Mathis,C. (2007). Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl.Med.Biol.* 34, 865-877.
- Driscoll,I., Howard,S.R., Stone,J.C., Monfils,M.H., Tomanek,B., Brooks,W.M., y Sutherland,R.J. (2006). The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139, 1173-1185.
- Dudai,Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current opinion in neurobiology* 12, 211-216.

Bibliografía

- Dunn,A.J. (1988). Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. *Life Sci.* 43, 429-435.
- Dunn,A.J. y Berridge,C.W. (1990). Is corticotropin-releasing factor a mediator of stress responses? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 579, 183-191.
- Dunn,J.D. y Orr,S.E. (1984). Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Exp.Brain Res.* 54, 1-6.
- Dunn,J.D. y Whitener,J. (1986). Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology* 42, 211-217.
- Durand,M., Sarrieau,A., Aguerre,S., Mormede,P., y Chaouloff,F. (1998). Differential effects of neonatal handling on anxiety, corticosterone response to stress, and hippocampal glucocorticoid and serotonin (5-HT)2A receptors in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology* 23, 323-335.
- Durbec,P. y Cremer,H. (2001). Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Molecular neurobiology* 24, 53-64.
- Dusselier,L., Dunn,B., Wang,Y., Shelley,M.C., y Whalen,D.F. (2005). Personal, health, academic, and environmental predictors of stress for residence hall students. *J.Am.Coll.Health* 54, 15-24.
- Edelman,G.M. (1987). CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunol.Rev.* 100, 11-45.
- Edelman,G.M. y Crossin,K.L. (1991). Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu.Rev.Biochem.* 60, 155-190.
- Einstein,G. (1988). Intracellular injection of lucifer yellow into cortical neurons in lightly fixed sections and its application to human autopsy material. *J.Neurosci.Methods* 26, 95-103.
- Eisenstein,E.M. y Carlson,A.D. (1997). A comparative approach to the behavior called "learned helplessness". *Behav.Brain Res.* 86, 149-160.
- El Hage,W., Peronny,S., Griebel,G., y Belzung,C. (2004). Impaired memory following predatory stress in mice is improved by fluoxetine. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 28, 123-128.
- Elston,G.N., Pow,D.V., y Calford,M.B. (1997). Neuronal composition and morphology in layer IV of two vibrissal barrel subfields of rat cortex. *Cereb.Cortex* 7, 422-431.
- Engelmann,M., Landgraf,R., y Wotjak,C.T. (2004). The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 25, 132-149.
- Ennaceur,A. y Aggleton,J.P. (1997). The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav.Brain Res.* 88, 181-193.
- Ennaceur,A. y Delacour,J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats: I. Behavioral data. *Behavioural brain research* 31, 47-59.
- Ennaceur,A., Michalikova,S., Bradford,A., y Ahmed,S. (2005). Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav.Brain Res.* 159, 247-266.
- Ennaceur,A., Michalikova,S., y Chazot,P.L. (2006). Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behav.Brain Res.* 171, 26-49.
- Ennaceur,A., Neave,N., y Aggleton,J.P. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp.Brain Res.* 113, 509-519.

- Escobar,M.L., Chao,V., y Bermudez-Rattoni,F. (1998). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.* 779, 314-319.
- Exner,M. y Clark,D. (1993). Behaviour in the novel environment predicts responsiveness to d-amphetamine in the rat: a multivariate approach. *Behav.Pharmacol.* 4, 47-56.
- Farisse,J., Hery,F., Barden,N., Hery,M., y Boulenguez,P. (2000). Central 5-HT(1) and 5-HT(2) binding sites in transgenic mice with reduced glucocorticoid receptor number. *Brain Res.* 862, 145-153.
- Fazeli,M.S., Breen,K., Errington,M.L., y Bliss,T.V. (1994). Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci.Lett.* 169, 77-80.
- Feldman,S., Conforti,N., Itzik,A., y Weidenfeld,J. (1994). Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. *Brain Res.* 658, 21-26.
- Feldon,J. y Weiner,I. (1992). From an animal model of an attentional deficit towards new insights into the pathophysiology of schizophrenia. *J Psychiatr.Res.* 26, 345-366.
- FENDLER,K., KARMOS,G., y TELEGDY,G. (1961). The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function. *Acta Physiol Acad.Sci.Hung.* 20, 293-297.
- Ferbinteanu,J. y McDonald,R.J. (2001). Dorsal/ventral hippocampus, fornix, and conditioned place preference. *Hippocampus* 11, 187-200.
- Ferbinteanu,J. y Shapiro,M.L. (2003). Prospective and retrospective memory coding in the hippocampus. *Neuron* 40, 1227-1239.
- Ferguson,D. y Sapolsky,R. (2007). Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J.Neurosci.* 27, 8046-8052.
- Ferguson,S.A. y Cada,A.M. (2004). Spatial learning/memory and social and nonsocial behaviors in the spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rat strains. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 77, 583-594.
- Fernandes,G.A., Perks,P., Cox,N.K., Lightman,S.L., Ingram,C.D., y Shanks,N. (2002). Habituation and cross-sensitization of stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity: effect of lesions in the paraventricular nucleus of the thalamus or bed nuclei of the stria terminalis. *J.Neuroendocrinol.* 14, 593-602.
- Ferry,B., Roozendaal,B., y McGaugh,J.L. (1999). Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol.Psychiatry* 46, 1140-1152.
- Fields,R.D. y Itoh,K. (1996). Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19, 473-480.
- Figueiredo,H.F., Bruestle,A., Bodie,B., Dolgas,C.M., y Herman,J.P. (2003). The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur.J.Neurosci.* 18, 2357-2364.
- File,S.E., Andrews,N., al Farhan,M., y Wu,P.Y. (1993). The role of 5-HT in the anxiogenic effects of acute ethanol withdrawal and in the long-lasting cognitive deficits. *Alcohol Alcohol Suppl* 2, 495-499.
- Finn,D.A., Rutledge-Gorman,M.T., y Crabbe,J.C. (2003). Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics.* 4, 109-135.
- Flint,J. (2003). Animal models of anxiety and their molecular dissection. *Semin.Cell Dev.Biol.* 14, 37-42.
- Flood,J.F., Bennett,E.L., Orme,A.E., Rosenzweig,M.R., y Jarvik,M.E. (1978). Memory: modification of anisomycin-induced amnesia by stimulants and depressants. *Science* 199, 324-326.

Bibliografía

- Foley,A.G., Hartz,B.P., Gallagher,H.C., Ronn,L.C., Berezin,V., Bock,E., y Regan,C.M. (2000). A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM) Igl domain prevents NCAM internalization and disrupts passive avoidance learning. *J Neurochem.* 74, 2607-2613.
- Foley,A.G., Ronn,L.C., Murphy,K.J., y Regan,C.M. (2003). Distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat septal nuclei and septohippocampal pathway: transient increase of polysialylated interneurons in the subtriangular septal zone during memory consolidation. *J.Neurosci.Res.* 74, 807-817.
- Follesa,P. y Mocchetti,I. (1993). Regulation of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor mRNA by beta-adrenergic receptor activation and adrenal steroids in rat central nervous system. *Mol.Pharmacol.* 43, 132-138.
- Fowler,H., BLOND,J., y Dember,W.N. (1959). Alternation behavior and learning: the influence of reinforcement magnitude, number, and contingency. *J.Comp Physiol Psychol.* 52, 609-614.
- Fox,G.B., Fichera,G., Barry,T., O'Connell,A.W., Gallagher,H.C., Murphy,K.J., y Regan,C.M. (2000). Consolidation of passive avoidance learning is associated with transient increases of polysialylated neurons in layer II of the rat medial temporal cortex. *J.Neurobiol.* 45, 135-141.
- Fox,G.B., O'Connell,A.W., Murphy,K.J., y Regan,C.M. (1995). Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J.Neurochem.* 65, 2796-2799.
- Foy,M.R., Stanton,M.E., Levine,S., y Thompson,R.F. (1987). Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Behav.Neural Biol.* 48, 138-149.
- Francis,D.D., Zaharia,M.D., Shanks,N., y Anisman,H. (1995). Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability. *Physiol Behav.* 58, 57-65.
- Frank,E., Salchner,P., Aldag,J.M., Salome,N., Singewald,N., Landgraf,R., y Wigger,A. (2006). Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. *Behav.Neurosci.* 120, 60-71.
- Frazer,A. y Hensler,J.G. (1990). 5-HT1A receptors and 5-HT1A-mediated responses: effect of treatments that modify serotonergic neurotransmission. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 600, 460-474.
- Frederickson,C.J. y Frederickson,M.H. (1979). Emergence of spontaneous alternation in the kitten. *Dev.Psychobiol.* 12, 615-621.
- French,J.A., Fite,J.E., Jensen,H., Oparowski,K., Rukstalis,M.R., Fix,H., Jones,B., Maxwell,H., Pacer,M., Power,M.L., y Schulkin,J. (2007). Treatment with CRH-1 antagonist antalarmin reduces behavioral and endocrine responses to social stressors in marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Am.J.Primatol.* 69, 877-889.
- Frey,S., Bergado-Rosado,J., Seidenbecher,T., Pape,H.C., y Frey,J.U. (2001). Reinforcement of early long-term potentiation (early-LTP) in dentate gyrus by stimulation of the basolateral amygdala: heterosynaptic induction mechanisms of late-LTP. *Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 3697-3703.
- Frick,K.M., Burlingame,L.A., Arters,J.A., y Berger-Sweeney,J. (2000). Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience* 95, 293-307.
- Fuchs,E. y Flugge,G. (1998). Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. *Neurosci Biobehav.Rev.* 23, 295-300.
- Fujikawa,T., Soya,H., Fukuoka,H., Alam,K.S., Yoshizato,H., McEwen,B.S., y Nakashima,K. (2000). A biphasic regulation of receptor mRNA expressions for growth hormone, glucocorticoid and mineralocorticoid in the rat dentate gyrus during acute stress. *Brain Res.* 874, 186-193.

- Fumagalli,F., Bedogni,F., Slotkin,T.A., Racagni,G., y Riva,M.A. (2005). Prenatal stress elicits regionally selective changes in basal FGF-2 gene expression in adulthood and alters the adult response to acute or chronic stress. *Neurobiol.Dis.* 20, 731-737.
- Funder,J.W. (1993). Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science* 259, 1132-1133.
- Fuster,J.M. (1991). The prefrontal cortex and its relation to behavior. *Prog.Brain Res.* 87, 201-211.
- Fux,C.M., Krug,M., Dityatev,A., Schuster,T., y Schachner,M. (2003). NCAM180 and glutamate receptor subtypes in potentiated spine synapses: an immunogold electron microscopic study. *Mol.Cell Neurosci.* 24, 939-950.
- Fuxe,K., Diaz,R., Cintra,A., Bhatnagar,M., Tinner,B., Gustafsson,J.A., Ogren,S.O., y Agnati,L.F. (1996). On the role of glucocorticoid receptors in brain plasticity. *Cell Mol.Neurobiol.* 16, 239-258.
- Fuxe,K., Wikstrom,A.C., Okret,S., Agnati,L.F., Harfstrand,A., Yu,Z.Y., Granholm,L., Zoli,M., Vale,W., y Gustafsson,J.A. (1985). Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 117, 1803-1812.
- Gadea,A. y Lopez-Colome,A.M. (2001a). Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J.Neurosci.Res.* 63, 453-460.
- Gadea,A. y Lopez-Colome,A.M. (2001b). Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA III. Glycine transporters. *J.Neurosci.Res.* 64, 218-222.
- Gadea,A. y Lopez-Colome,A.M. (2001c). Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J.Neurosci.Res.* 63, 461-468.
- Gadek-Michalska,A. y Bugajski,J. (2003). Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. *J.Physiol Pharmacol.* 54, 449-459.
- Garcia,A. y Amario,A. (2001). Individual differences in the recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis after termination of exposure to a severe stressor in outbred male Sprague-Dawley rats. *Psychoneuroendocrinology* 26, 363-374.
- Gegelashvili,G., Andersson,A.M., Schousboe,A., y Bock,E. (1993). Characterization of NCAM diversity in cultured neurons. *FEBS letters* 324, 337-340.
- Gerlach,J.L. y McEwen,B.S. (1972). Rat brain binds adrenal steroid hormone: radioautography of hippocampus with corticosterone. *Science* 175, 1133-1136.
- Gerra,G., Zaimovic,A., Timpano,M., Zambelli,U., Delsignore,R., y Brambilla,F. (2000). Neuroendocrine correlates of temperamental traits in humans. *Psychoneuroendocrinology* 25, 479-496.
- Ghizoni,D.M., Joao,L.M., Moratelli,N.L., da Cunha,I.C., Orlandi,P.L., Borges,F.R., Battisti,R., de Oliveira,L.G., Meneghini,L., Lucinda,A.M., Marino,N.J., Paschoalini,M.A., y Faria,M.S. (2006). The effects of metabolic stress and vagotomy on emotional learning in an animal model of anxiety. *Neurobiol.Learn.Mem.* 86, 107-116.
- Goelet,P., Castellucci,V.F., Schacher,S., y Kandel,E.R. (1986). The long and the short of long-term memory—a molecular framework. *Nature* 322, 419-422.
- Gold,P.E. (2003). Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol.Learn.Mem.* 80, 194-210.
- Gold,P.E. (2004). Coordination of multiple memory systems. *Neurobiol.Learn.Mem.* 82, 230-242.
- Gold,P.E., Vogt,J., y Hall,J.L. (1986). Glucose effects on memory: behavioral and pharmacological characteristics. *Behav.Neural Biol.* 46, 145-155.

Bibliografía

- Gold,P.W., Goodwin,F.K., y Chrousos,G.P. (1988a). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1). *N.Engl.J.Med.* 319, 348-353.
- Gold,P.W., Goodwin,F.K., y Chrousos,G.P. (1988b). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2). *N.Engl.J.Med.* 319, 413-420.
- Gomez-Pinilla,F., Dao,L., Choi,J., y Ryba,E.A. (2000). Diazepam induces FGF-2 mRNA in the hippocampus and striatum. *Brain Res.Bull.* 53, 283-289.
- Gordon,J.A. y Hen,R. (2004). Genetic approaches to the study of anxiety. *Annu.Rev.Neurosci.* 27, 193-222.
- Gouirand,A.M. y Matuszewich,L. (2005). The effects of chronic unpredictable stress on male rats in the water maze. *Physiol Behav.* 86, 21-31.
- Gould,E., McEwen,B.S., Tanapat,P., Galea,L.A., y Fuchs,E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17, 2492-2498.
- Gould,E. y Tanapat,P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol.Psychiatry* 46, 1472-1479.
- Gould,E., Tanapat,P., McEwen,B.S., Flugge,G., y Fuchs,E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3168-3171.
- Gould,E., Woolley,C.S., y McEwen,B.S. (1991). Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *J Comp Neurol.* 313, 479-485.
- Graeff,F.G. (2003). [Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder]. *Rev.Bras.Psiquiatr.* 25 Suppl 2, 42-45.
- Graf,P. y Schacter,D.L. (1985). Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *J.Exp.Psychol.Learn.Mem.Cogn* 11, 501-518.
- Grant,N.J., Claudepierre,T., Aunis,D., y Langley,K. (1996). Glucocorticoids and nerve growth factor differentially modulate cell adhesion molecule L1 expression in PC12 cells. *J.Neurochem.* 66, 1400-1408.
- Grant,S.J. y Redmond,D.E., Jr. (1984). Neuronal activity of the locus ceruleus in awake *Macaca arctoides*. *Exp.Neurol.* 84, 701-708.
- Gray,J.A. (1983). A theory of anxiety: the role of the limbic system. *Encephale* 9, 161B-166B.
- Gray,J.A. y McNaughton,N. (1983). Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 7, 119-188.
- Gray,J.D., Punsoni,M., Tabori,N.E., Melton,J.T., Fanslow,V., Ward,M.J., Zupan,B., Menzer,D., Rice,J., Drake,C.T., Romeo,R.D., Brake,W.G., Torres-Reveron,A., y Milner,T.A. (2007). Methylphenidate administration to juvenile rats alters brain areas involved in cognition, motivated behaviors, appetite, and stress. *J.Neurosci.* 27, 7196-7207.
- Gresch,P.J., Sved,A.F., Zigmond,M.J., y Finlay,J.M. (1995). Local influence of endogenous norepinephrine on extracellular dopamine in rat medial prefrontal cortex. *J.Neurochem.* 65, 111-116.
- Griebel,G., Cohen,C., Perrault,G., y Sanger,D.J. (1999a). Behavioral effects of acute and chronic fluoxetine in Wistar-Kyoto rats. *Physiol Behav.* 67, 315-320.
- Griebel,G., Rodgers,R.J., Perrault,G., y Sanger,D.J. (1997). Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 57, 817-827.
- Griebel,G., Rodgers,R.J., Perrault,G., y Sanger,D.J. (1999b). Behavioural profiles in the mouse defence test battery suggest anxiolytic potential of 5-HT(1A) receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 144, 121-130.

- Griffiths,S.W., Brockmark,S., Hojesjo,J., y Johnsson,J.I. (2004). Coping with divided attention: the advantage of familiarity. *Proc.Biol.Sci.* 271, 695-699.
- Grootendorst,J., Oitzl,M.S., Dalm,S., Enthoven,L., Schachner,M., de Kloet,E.R., y Sandi,C. (2001). Stress alleviates reduced expression of cell adhesion molecules (NCAM, L1), and deficits in learning and corticosterone regulation of apolipoprotein E knockout mice. *European journal of neuroscience* 14, 1505-1514.
- Guayerbas,N., Catalan,M., Victor,V.M., Miquel,J., y De la,F.M. (2002). Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav.Brain Res.* 134, 41-48.
- Guillemin,R. y Hearn,W.R. (1955). ACTH release by in vitro pituitary; effect of pitressin and purified arginine-vasopressin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 89, 365-367.
- Gunnar,M. y Quevedo,K. (2007). The neurobiology of stress and development. *Annu.Rev.Psychol.* 58, 145-173.
- Habib,K.E., Gold,P.W., y Chrousos,G.P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 30, 695-728.
- Hajos,M., Richards,C.D., Szekely,A.D., y Sharp,T. (1998). An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* 87, 95-108.
- Hall,J.F. (1986). The conditional emotional response as a model of Pavlovian conditioning. *Pavlov.J.Biol.Sci.* 21, 1-11.
- Hall,J.L. y Gold,P.E. (1986). The effects of training, epinephrine, and glucose injections on plasma glucose levels in rats. *Behav.Neural Biol.* 46, 156-167.
- Hannesson,D.K., Howland,J.G., Pollock,M., Mohapel,P., Wallace,A.E., y Corcoran,M.E. (2005). Anterior perirhinal cortex kindling produces long-lasting effects on anxiety and object recognition memory. *Eur.J.Neurosci.* 21, 1081-1090.
- Hansson,A.C., Cintra,A., Belluardo,N., Sommer,W., Bhatnagar,M., Bader,M., Ganten,D., y Fuxe,K. (2000). Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur.J.Neurosci.* 12, 2918-2934.
- Hariri,A.R., Mattay,V.S., Tessitore,A., Fera,F., y Weinberger,D.R. (2003). Neocortical modulation of the amygdala response to fearful stimuli. *Biol.Psychiatry* 53, 494-501.
- Harris,K.M. y Stevens,J.K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J.Neurosci.* 9, 2982-2997.
- Harro,J. (2002). Long-term partial 5-HT depletion: interference of anxiety and impulsivity? *Psychopharmacology (Berl)* 164, 433-434.
- Hassan,A.H., Patchev,V.K., von Rosenstiel,P., Holsboer,F., y Almeida,O.F. (1999). Plasticity of hippocampal corticosteroid receptors during aging in the rat. *FASEB J.* 13, 115-122.
- Hassan,A.H., von Rosenstiel,P., Patchev,V.K., Holsboer,F., y Almeida,O.F. (1996). Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp.Neurol.* 140, 43-52.
- Hassert,D.L., Miyashita,T., y Williams,C.L. (2004). The effects of peripheral vagal nerve stimulation at a memory-modulating intensity on norepinephrine output in the basolateral amygdala. *Behav.Neurosci.* 118, 79-88.
- Hatfield,T. y McGaugh,J.L. (1999). Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol.Learn.Mem.* 71, 232-239.
- Hatfield,T., Spanis,C., y McGaugh,J.L. (1999). Response of amygdalar norepinephrine to footshock and GABAergic drugs using in vivo microdialysis and HPLC. *Brain Res.* 835, 340-345.

1. Hatton, G.I. (1997). Function-related plasticity in hypothalamus. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 375-397.
2. Hauger, R.L., Thrivikraman, K.V., y Plotsky, P.M. (1994). Age-related alterations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male Fischer 344 rats. *Endocrinology* 134, 1528-1536.
3. Hayashi, Y. y Majewska, A.K. (2005). Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. *Neuron* 46, 529-532.
4. Haynes, L.E., Lendon, C.L., Barber, D.J., y Mitchell, I.J. (2003). 17 Beta-oestradiol attenuates dexamethasone-induced lethal and sublethal neuronal damage in the striatum and hippocampus. *Neuroscience* 120, 799-806.
5. Haynes, T., Gutierrez, C., Aycinena, J.C., Tsonis, P.A., y Rio-Tsonis, K. (2007). BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 20380-20385.
6. Hebb, D.O. The organization of behavior: a neuropsychological theory. 1949. New York, Wiley.
7. Heilig, M. (2004). The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides* 38, 213-224.
8. Heine, V.M., Maslam, S., Zareno, J., Joels, M., y Lucassen, P.J. (2004). Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur. J Neurosci* 19, 131-144.
9. Heinrichs, S.C., Lapsansky, J., Lovenberg, T.W., De Souza, E.B., y Chalmers, D.T. (1997). Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. *Regul. Pept.* 71, 15-21.
10. Heinrichs, S.C., Menzaghi, F., Pich, E.M., Baldwin, H.A., Rassnick, S., Britton, K.T., y Koob, G.F. (1994). Anti-stress action of a corticotropin-releasing factor antagonist on behavioral reactivity to stressors of varying type and intensity. *Neuropsychopharmacology* 11, 179-186.
11. Heisler, L.K., Chu, H.M., Brennan, T.J., Danao, J.A., Bajwa, P., Parsons, L.H., y Tecott, L.H. (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 15049-15054.
12. Herman, J.P., Adams, D., y Prewitt, C. (1995). Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* 61, 180-190.
13. Herman, J.P. y Cullinan, W.E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78-84.
14. Herman, J.P., Dolgas, C.M., y Carlson, S.L. (1998). Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86, 449-459.
15. Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., y Cullinan, W.E. (2003a). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 24, 151-180.
16. Herman, J.P., Prewitt, C.M., y Cullinan, W.E. (1996). Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev. Neurobiol.* 10, 371-394.
17. Herman, J.P., Renda, A., y Bodie, B. (2003b). Norepinephrine-gamma-aminobutyric acid (GABA) interaction in limbic stress circuits: effects of reboxetine on GABAergic neurons. *Biol. Psychiatry* 53, 166-174.
18. Herman, J.P., Schafer, K.H., Sladek, C.D., Day, R., Young, E.A., Akil, H., y Watson, S.J. (1989). Chronic electroconvulsive shock treatment elicits up-regulation of CRF and AVP mRNA in select populations of neuroendocrine neurons. *Brain Res.* 501, 235-246.
19. Herman, J.P., Watson, S.J., y Spencer, R.L. (1999). Defense of adrenocorticosteroid receptor expression in rat hippocampus: effects of stress and strain. *Endocrinology* 140, 3981-3991.

Bibliografía

- Hernandez-Rabaza,V., Barcia,J.A., Llorens-Martin,M., Trejo,J.L., y Canales,J.J. (2007). Spared place and object-place learning but limited spatial working memory capacity in rats with selective lesions of the dentate gyrus. *Brain Res.Bull.* 72, 315-323.
- Herrero,A.I., Sandi,C., y Venero,C. (2006). Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiol.Learn.Mem.*
- Hilton,A. (1969). Partial reinforcement of a conditioned emotional response in rats. *J.Comp Physiol Psychol.* 69, 253-260.
- Hirsch,J.C. y Crepel,F. (1990). Use-dependent changes in synaptic efficacy in rat profrontal neurons in vitro. *J.PHYSIOL.* 427, 31-49.
- Hodges,H. (1996). Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res.Cogn Brain Res.* 3, 167-181.
- Hoffman,K.B., Larson,J., Bahr,B.A., y Lynch,G. (1998). Activation of NMDA receptors stimulates extracellular proteolysis of cell adhesion molecules in hippocampus. *Brain Res.* 811, 152-155.
- Hoffman,S. y Edelman,G.M. (1983). Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80, 5762-5766.
- Holsboer,F. (1999). The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J.Psychiatr.Res.* 33, 181-214.
- Holsboer,F., Grasser,A., Friess,E., y Wiedemann,K. (1994). Steroid effects on central neurons and implications for psychiatric and neurological disorders. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 746, 345-359.
- Holstege,G., Meiners,L., y Tan,K. (1985). Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. *Exp.Brain Res.* 58, 379-391.
- Hood,S.D., Hince,D.A., Robinson,H., Cirillo,M., Christmas,D., y Kaye,J.M. (2006). Serotonin regulation of the human stress response. *Psychoneuroendocrinology* 31, 1087-1097.
- Hughes,R.N. (2003). Effects of glucose on responsiveness to change in young adult and middle-aged rats. *Physiol Behav.* 78, 529-534.
- Hugin-Flores,M.E., Steimer,T., Aubert,M.L., y Schulz,P. (2004). Mineralo- and glucocorticoid receptor mrnas are differently regulated by corticosterone in the rat hippocampus and anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 79, 174-184.
- Hui,G.K., Figueroa,I.R., Poytress,B.S., Roozendaal,B., McGaugh,J.L., y Weinberger,N.M. (2004). Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiol.Learn.Mem.* 81, 67-74.
- Hurley,K.M., Herbert,H., Moga,M.M., y Saper,C.B. (1991). Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J.Comp Neurol.* 308, 249-276.
- Ikegaya,Y., Abe,K., Saito,H., y Nishiyama,N. (1995). Medial amygdala enhances synaptic transmission and synaptic plasticity in the dentate gyrus of rats in vivo. *J.Neurophysiol.* 74, 2201-2203.
- Ikegaya,Y., Nakanishi,K., Saito,H., y Abe,K. (1997). Amygdala beta-noradrenergic influence on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Neuroreport* 8, 3143-3146.
- Ikegaya,Y., Saito,H., y Abe,K. (1994). Attenuated hippocampal long-term potentiation in basolateral amygdala-lesioned rats. *Brain Res.* 656, 157-164.
- Introini-Collison,I.B. y McGaugh,J.L. (1986). Epinephrine modulates long-term retention of an aversively motivated discrimination. *Behav.Neural Biol.* 45, 358-365.

- Isaac, J.T. (2003). Postsynaptic silent synapses: evidence and mechanisms. *Neuropharmacology* 45, 450-460.
- Isgor, C., Kabbaj, M., Akil, H., y Watson, S.J. (2004). Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus* 14, 636-648.
- Issa, A.M., Rowe, W., Gauthier, S., y Meaney, M.J. (1990). Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 10, 3247-3254.
- Isseroff, A. (1979). Limited recovery of spontaneous alternation after extensive hippocampal damage: evidence for a memory impairment. *Exp. Neurol.* 64, 284-294.
- Isseroff, A. (1980). Facilitation of delayed spontaneous alternation behavior in adult rats following early hydroxyzine treatment: differential sensitivity in late infancy. *Psychopharmacology (Berl)* 69, 179-181.
- Ito, M. (1989). Long-term depression. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 85-102.
- Ito, T., Morita, N., Nishi, M., y Kawata, M. (2000). In vitro and in vivo immunocytochemistry for the distribution of mineralocorticoid receptor with the use of specific antibody. *Neurosci. Res.* 37, 173-182.
- Izquierdo, I. y McGaugh, J.L. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.* 11, 517-534.
- Jacobs, B.L. y Fornal, C.A. (1999). Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 21, 9S-15S.
- Jacobson, L. y Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* 12, 118-134.
- Jakovcevski, M., Schachner, M., y Morellini, F. (2007). Individual variability in the stress response of C57BL/6J male mice correlates with trait anxiety. *Genes Brain Behav.*
- Jeffery, K.J. y Hayman, R. (2004). Plasticity of the hippocampal place cell representation. *Rev. Neurosci.* 15, 309-331.
- Jessen, U., Novitskaya, V., Pedersen, N., Serup, P., Berezin, V., y Bock, E. (2001). The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuritogenesis in PC12-E2 cells. *J Neurochem.* 79, 1149-1160.
- Jezova, D., Makatsori, A., Duncko, R., Moncek, F., y Jakubek, M. (2004). High trait anxiety in healthy subjects is associated with low neuroendocrine activity during psychosocial stress. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 1331-1336.
- Jin, K., Minami, M., Xie, L., Sun, Y., Mao, X.O., Wang, Y., Simon, R.P., y Greenberg, D.A. (2004). Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. *Aging Cell* 3, 373-377.
- Joels, M., Karst, H., Alfarez, D., Heine, V.M., Qin, Y., Van Riel, E., Verkuyl, M., Lucassen, P.J., y Krugers, H.J. (2004). Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress.* 7, 221-231.
- Johnson, C.T., Olton, D.S., Gage, F.H., III, y Jenko, P.G. (1977). Damage to hippocampus and hippocampal connections: effects on DRL and spontaneous alternation. *J. Comp Physiol Psychol.* 91, 508-522.
- Jorgensen, O.S. (1995). Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem. Res.* 20, 533-547.
- Kaada, B.R., Feldman, R.S., y Langfeldt, T. (1971). Failure to modulate autonomic reflex discharge by hippocampal stimulation in rabbits. *Physiol Behav.* 7, 225-231.
- Kalueff, A. y Nutt, D.J. (1996). Role of GABA in memory and anxiety. *Depress. Anxiety.* 4, 100-110.

- Kalueff,A.V. (2007). Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. *Neural Plast.* 78171.
- Kalueff,A.V. y Nutt,D.J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depress.Anxiety.* 24, 495-517.
- Kalynchuk,L.E. (2000). Long-term amygdala kindling in rats as a model for the study of interictal emotionality in temporal lobe epilepsy. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 24, 691-704.
- Kamiguchi,H. y Lemmon,V. (2000). IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12, 598-605.
- Kandel,E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.
- Kant,G.J., Meyerhoff,J.L., y Jarrard,L.E. (1984). Biochemical indices of reactivity and habituation in rats with hippocampal lesions. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 20, 793-797.
- Kaplan,M.S. y Hinds,J.W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-1094.
- Kapp,B.S., Gallagher,M., Holmquist,B.K., y Theall,C.L. (1978). Retrograde amnesia and hippocampal stimulation: dependence upon the nature of associations formed during conditioning. *Behav.Biol.* 24, 1-23.
- Kapp,B.S., Supple,W.F., Jr., y Whalen,P.J. (1994). Effects of electrical stimulation of the amygdaloid central nucleus on neocortical arousal in the rabbit. *Behav.Neurosci.* 108, 81-93.
- Karandrea,D., Kittas,C., y Kitraki,E. (2002). Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology* 75, 217-226.
- Karst,H., Berger,S., Turiault,M., Tronche,F., Schutz,G., y Joels,M. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 19204-19207.
- Kart-Teke,E., Souza Silva,M.A., Huston,J.P., y Dere,E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiol.Learn.Mem.* 85, 173-182.
- Karten,Y.J., Olariu,A., y Cameron,H.A. (2005). Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood. *Trends Neurosci* 28, 171-172.
- Kasai,H., Matsuzaki,M., Noguchi,J., Yasumatsu,N., y Nakahara,H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26, 360-368.
- Kash,S.F., Tecott,L.H., Hodge,C., y Baekkeskov,S. (1999). Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 1698-1703.
- Kawano,S., Ohmori,S., Kanda,K., Ito,T., Murata,Y., y Seo,H. (1994). Adrenocortical response to tail-suspension in young and old rats. *Environ.Med.* 38, 7-12.
- Keck,M.E., Wigger,A., Welt,T., Muller,M.B., Gesing,A., Reul,J.M., Holsboer,F., Landgraf,R., y Neumann,I.D. (2002). Vasopressin mediates the response of the combined dexamethasone/CRH test in hyper-anxious rats: implications for pathogenesis of affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 26, 94-105.
- Keck,P.E., Jr., McElroy,S.L., Havens,J.R., Altshuler,L.L., Nolen,W.A., Frye,M.A., Suppes,T., Denicoff,K.D., Kupka,R., Leverich,G.S., Rush,A.J., y Post,R.M. (2003). Psychosis in bipolar disorder: phenomenology and impact on morbidity and course of illness. *Compr.Psychiatry* 44, 263-269.
- Keim,K.L. y Sigg,E.B. (1976). Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 4, 289-297.

- Kempermann, G. y Gage, F.H. (2002). Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur.J.Neurosci.* 16, 129-136.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., y Gage, F.H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18, 3206-3212.
- Kent, J.M., Mathew, S.J., y Gorman, J.M. (2002). Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biol.Psychiatry* 52, 1008-1030.
- Kerr, D.S., Campbell, L.W., Applegate, M.D., Brodich, A., y Landfield, P.W. (1991). Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *J Neurosci* 11, 1316-1324.
- Kesner, R.P. y Giles, R. (1998). Neural circuit analysis of spatial working memory: role of pre- and parasubiculum, medial and lateral entorhinal cortex. *Hippocampus* 8, 416-423.
- Kim, J.B., Ju, J.Y., Kim, J.H., Kim, T.Y., Yang, B.H., Lee, Y.S., y Son, H. (2004). Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Brain Res.* 1027, 1-10.
- Kim, J.J. y Fanselow, M.S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675-677.
- Kim, J.J. y Yoon, K.S. (1998). Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 21, 505-509.
- Kirkby, R.J., Stein, D.G., Kimble, R.J., y Kimble, D.P. (1967). Effects of hippocampal lesions and duration of sensory input on spontaneous alternation. *J.Comp Physiol Psychol.* 64, 342-345.
- Kiselyov, V.V., Skladchikova, G., Hinsby, A.M., Jensen, P.H., Kulahin, N., Soroka, V., Pedersen, N., Tsetlin, V., Poulsen, F.M., Berezin, V., y Bock, E. (2003). Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure (Camb)* 11, 691-701.
- Kishimoto, T., Radulovic, J., Radulovic, M., Lin, C.R., Schrick, C., Hooshmand, F., Hermanson, O., Rosenfeld, M.G., y Spiess, J. (2000). Deletion of *chr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat.Genet.* 24, 415-419.
- Kiss, J.Z. y Muller, D. (2001). Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Rev.Neurosci.* 12, 297-310.
- Kitraki, E., Karandrea, D., y Kittas, C. (1999). Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. *Neuroendocrinology* 69, 331-338.
- Klein, E., Zohar, J., Geraci, M.F., Murphy, D.L., y Uhde, T.W. (1991). Anxiogenic effects of m-CPP in patients with panic disorder: comparison to caffeine's anxiogenic effects. *Biol.Psychiatry* 30, 973-984.
- Klemenhagen, K.C., Gordon, J.A., David, D.J., Hen, R., y Gross, C.T. (2006). Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 31, 101-111.
- Klementiev, B., Novikova, T., Novitskaya, V., Walmod, P.S., Dmytriyeva, O., Pakkenberg, B., Berezin, V., y Bock, E. (2007). A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Aβ(25-35). *Neuroscience* 145, 209-224.
- Knafo, S., Barkai, E., Herrero, A.I., Libersat, F., Sandi, C., y Venero, C. (2005). Olfactory learning-related NCAM expression is state, time, and location specific and is correlated with individual learning capabilities. *Hippocampus* 15, 316-325.
- Knafo, S., Venero, C., Sandi, C., Borcel, E., Suárez, L., Solís, J.M., Alonso-Nanclares, L., Rodríguez, J.R., Bock, E., Bezerin, V., y de Felipe, J. (2008). Altered hippocampal dendritic spines and LTP following peripheral administration of a cognitive enhancer that mimics NCAM. *Journal of Neuroscience.*
- Knigge, K.M. (1961). Adrenocortical response to stress in rats with lesions in hippocampus and amygdala.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 108, 18-21.

- Knigge,K.M. y HAYS,M. (1963). EVIDENCE OF INHIBITIVE ROLE OF HIPPOCAMPUS IN NEURAL REGULATION OF ACTH RELEASE. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 114, 67-69.
- Kolkova,K., Novitskaya,V., Pedersen,N., Berezin,V., y Bock,E. (2000). Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. J.Neurosci. 20, 2238-2246.
- Kollack-Walker,S., Watson,S.J., y Akil,H. (1997). Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. J.Neurosci. 17, 8842-8855.
- Koo,J.W., Park,C.H., Choi,S.H., Kim,N.J., Kim,H.S., Choe,J.C., y Suh,Y.H. (2003). The postnatal environment can counteract prenatal effects on cognitive ability, cell proliferation, and synaptic protein expression. FASEB J. 17, 1556-1558.
- Korol,D.L. (2002). Enhancing cognitive function across the life span. Ann.N.Y.Acad.Sci. 959, 167-179.
- Korpi,E.R., Grunder,G., y Luddens,H. (2002). Drug interactions at GABA(A) receptors. Prog.Neurobiol. 67, 113-159.
- Korte,S.M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. Neurosci.Biobehav.Rev. 25, 117-142.
- Korte,S.M., De Boer,S.F., de Kloet,E.R., y Bohus,B. (1995). Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. Psychoneuroendocrinology 20, 385-394.
- Korz,V. y Frey,J.U. (2003). Stress-related modulation of hippocampal long-term potentiation in rats: Involvement of adrenal steroid receptors. J.Neurosci. 23, 7281-7287.
- Kramarcy,N.R., Delanoy,R.L., y Dunn,A.J. (1984). Footshock treatment activates catecholamine synthesis in slices of mouse brain regions. Brain Res. 290, 311-319.
- Kreek,M.J. (1996). Opioid receptors: some perspectives from early studies of their role in normal physiology, stress responsivity, and in specific addictive diseases. Neurochem.Res. 21, 1469-1488.
- Kuhn,H.G., Dickinson-Anson,H., y Gage,F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J.Neurosci. 16, 2027-2033.
- Kuhn,H.G., Winkler,J., Kempermann,G., Thal,L.J., y Gage,F.H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. J Neurosci 17, 5820-5829.
- Kukekov,V.G., Laywell,E.D., Suslov,O., Davies,K., Scheffler,B., Thomas,L.B., O'Brien,T.F., Kusakabe,M., y Steindler,D.A. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. Exp.Neurol. 156, 333-344.
- Kuroda,Y. y McEwen,B.S. (1998). Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. Brain Res.Mol.Brain Res. 59, 35-39.
- Kusnecov,A.W., Liang,R., y Shurin,G. (1999). T-lymphocyte activation increases hypothalamic and amygdaloid expression of CRH mRNA and emotional reactivity to novelty. J.Neurosci. 19, 4533-4543.
- Lacaille,J.C., Mueller,A.L., Kunkel,D.D., y Schwartzkroin,P.A. (1987). Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. J.Neurosci. 7, 1979-1993.
- Lacroix,L., Spinelli,S., Heidbreder,C.A., y Feldon,J. (2000). Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices

Bibliografía

in fear and anxiety. *Behav. Neurosci.* **114**, 1119-1130.

- Lai, M., Horsburgh, K., Bae, S.E., Carter, R.N., Stenvers, D.J., Fowler, J.H., Yau, J.L., Gomez-Sanchez, C.E., Holmes, M.C., Kenyon, C.J., Seckl, J.R., y Macleod, M.R. (2007). Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 1832-1842.
- Lalonde, R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **26**, 91-104.
- Lalonde, R., Botez, M.I., y Boivin, D. (1986). Spontaneous alternation and habituation in a t-maze in nervous mutant mice. *Behav. Neurosci.* **100**, 350-352.
- Lamprecht, R. y LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 45-54.
- Landfield, P.W. y Eldridge, J.C. (1991). The glucocorticoid hypothesis of brain aging and neurodegeneration: recent modifications. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **125 Suppl 1**, 54-64.
- Landfield, P.W. y Eldridge, J.C. (1994). Evolving aspects of the glucocorticoid hypothesis of brain aging: hormonal modulation of neuronal calcium homeostasis. *Neurobiol. Aging* **15**, 579-588.
- Landgraf, R. y Wigger, A. (2002). High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav. Genet.* **32**, 301-314.
- Landgraf, R., Wigger, A., Holsboer, F., y Neumann, I.D. (1999). Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J. Neuroendocrinol.* **11**, 405-407.
- Lathe, R. (2001). Hormones and the hippocampus. *J. Endocrinol.* **169**, 205-231.
- LeDoux, J. (1998). Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol. Psychiatry* **44**, 1229-1238.
- LeDoux, J.E. (1992). Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 191-197.
- LeDoux, J.E. (1993). Emotional memory systems in the brain. *Behav. Brain Res.* **58**, 69-79.
- LeDoux, J.E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annu. Rev. Psychol.* **46**, 209-235.
- LeDoux, J.E. Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*. 23[1], 155. 2000. Annual Reviews Inc.
- Lee, K.S., Lim, B.V., Jang, M.H., Shin, M.C., Lee, T.H., Kim, Y.P., Shin, H.S., Cho, S.Y., Kim, H., Shin, M.S., Kim, E.H., y Kim, C.J. (2002). Hypothermia inhibits cell proliferation and nitric oxide synthase expression in rats. *Neurosci Lett.* **329**, 53-56.
- Lee, Y. y Davis, M. (1997). Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J. Neurosci.* **17**, 6434-6446.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., y Abrous, D.N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 11032-11037.
- Lesch, K.P. (2001). Molecular foundation of anxiety disorders. *J. Neural Transm.* **108**, 717-746.
- Leung, J.W. y Xue, H. (2003). GABAergic functions and depression: from classical therapies to herbal medicine. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* **2**, 363-374.
- Leverenz, J.B., Wilkinson, C.W., Wamble, M., Corbin, S., Grabber, J.E., Raskind, M.A., y Peskind, E.R. (1999). Effect of chronic high-dose exogenous cortisol on hippocampal neuronal number in aged nonhuman primates. *J. Neurosci* **19**, 2356-2361.
- Levy, A., Dachir, S., Arbel, I., y Kadar, T. (1994). Aging, stress, and cognitive function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **717**, 79-88.

Bibliografía

- Li,X.F., Armony,J.L., y LeDoux,J.E. (1996). GABAA and GABAB receptors differentially regulate synaptic transmission in the auditory thalamo-amygdala pathway: an in vivo microiontophoretic study and a model. *Synapse* 24, 115-124.
- Liang,K.C., Juler,R.G., y McGaugh,J.L. (1986). Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res.* 368, 125-133.
- Liebsch,G., Landgraf,R., Engelmann,M., Lorsch,P., y Holsboer,F. (1999). Differential behavioural effects of chronic infusion of CRH 1 and CRH 2 receptor antisense oligonucleotides into the rat brain. *J.Psychiatr.Res.* 33, 153-163.
- Liebsch,G., Landgraf,R., Gerstberger,R., Probst,J.C., Wotjak,C.T., Engelmann,M., Holsboer,F., y Montkowski,A. (1995). Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. *Regul.Pept.* 59, 229-239.
- Liebsch,G., Montkowski,A., Holsboer,F., y Landgraf,R. (1998). Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav.Brain Res.* 94, 301-310.
- Linnemann,D. y Skarsfelt,T. (1994). Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *Neurobiol.Aging* 15, 651-655.
- Lister,R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92, 180-185.
- Little,E.B., Crossin,K.L., Krushel,L.A., Edelman,G.M., y Cunningham,B.A. (2001). A short segment within the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is essential for N-CAM-induced NF-kappa B activity in astrocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 2238-2243.
- Lopez,J.F., Chalmers,D.T., Little,K.Y., y Watson,S.J. (1998). A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol.Psychiatry* 43, 547-573.
- Lopez-Fernandez,M.A., Montaron,M.F., Varea,E., Rougon,G., Venero,C., Abrous,D.N., y Sandi,C. (2007). Upregulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the dorsal hippocampus after contextual fear conditioning is involved in long-term memory formation. *J.Neurosci.* 27, 4552-4561.
- Lowy,M.T., Gault,L., y Yamamoto,B.K. (1993). Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem.* 61, 1957-1960.
- Lubow,R.E. y Gewirtz,J.C. (1995). Latent inhibition in humans: Data, theory, and implications for schizophrenia. *Psychological Bulletin* 117, 87-103.
- Lucassen,P.J., Heine,V.M., Muller,M.B., van der Beek,E.M., Wiegant,V.M., de Kloet,E.R., Joels,M., Fuchs,E., Swaab,D.F., y Czeh,B. (2006). Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS.Neurol.Disord.Drug Targets.* 5, 531-546.
- Lucassen,P.J., Vollmann-Honsdorf,G.K., Gleisberg,M., Czeh,B., de Kloet,E.R., y Fuchs,E. (2001). Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *Eur.J Neurosci* 14, 161-166.
- Luine,V., Villegas,M., Martinez,C., y McEwen,B.S. (1994). Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res.* 639, 167-170.
- Lundkvist,J., Chai,Z., Teheranian,R., Hasanvan,H., Bartfai,T., Jenck,F., Widmer,U., y Moreau,J.L. (1996). A non peptidic corticotropin releasing factor receptor antagonist attenuates fever and exhibits anxiolytic-like activity. *Eur.J.Pharmacol.* 309, 195-200.
- Lupien,S., Lecours,A.R., Lussier,I., Schwartz,G., Nair,N.P., y Meaney,M.J. (1994). Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. *J Neurosci* 14, 2893-2903.

Bibliografía

- Lupien, S.J., Gillin, C.J., y Hauger, R.L. (1999). Working memory is more sensitive than declarative memory to the acute effects of corticosteroids: a dose-response study in humans. *Behav. Neurosci.* 113, 420-430.
- Lupien, S.J. y McEwen, B.S. (1997). The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 24, 1-27.
- Ma, X.M. y Aguilera, G. (1999). Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids. *Endocrinology* 140, 5642-5650.
- Mabry, T.R., McCarty, R., Gold, P.E., y Foster, T.C. (1996). Age and stress history effects on spatial performance in a swim task in Fischer-344 rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66, 1-10.
- Mackenzie, T.B., Popkin, M.K., Sheppard, J.R., Stillner, V., Davis, C.M., y Fenimore, D.C. (1980). Changes in beta-adrenergic receptor sensitivity associated with stress. *Lancet* 1, 322.
- Magariños, A.M. y McEwen, B.S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* 69, 83-88.
- Magarinos, A.M., Verdugo, J.M., y McEwen, B.S. (1997). Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14002-14008.
- Maier, W., Gansicke, M., Freyberger, H.J., Linz, M., Heun, R., y Lecrubier, Y. (2000). Generalized anxiety disorder (ICD-10) in primary care from a cross-cultural perspective: a valid diagnostic entity? *Acta Psychiatr. Scand.* 101, 29-36.
- Makara, G.B. y Haller, J. (2001). Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog. Neurobiol.* 65, 367-390.
- Makino, S., Smith, M.A., y Gold, P.W. (1995). Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology* 136, 3299-3309.
- Malaguarnera, L., Ferlito, L., Imbesi, R.M., Gulizia, G.S., Di Mauro, S., Maugeri, D., Malaguarnera, M., y Messina, A. (2001). Immunosenescence: a review. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 32, 1-14.
- Malberg, J.E. y Duman, R.S. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28, 1562-1571.
- Mallo, T., Altho, A., Koiv, K., Tonissaa, M., Eller, M., y Harro, J. (2007). Rats with persistently low or high exploratory activity: behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behav. Brain Res.* 177, 269-281.
- Mann, J.J. y Arango, V. (1988). CNS adrenergic receptors and beta blockade. *Postgrad. Med. Spec No.* 135-139.
- Mann, J.J., McBride, P.A., Malone, K.M., DeMeo, M., y Keilp, J. (1995). Blunted serotonergic responsivity in depressed inpatients. *Neuropsychopharmacology* 13, 53-64.
- Maren, S. y Baudry, M. (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63, 1-18.
- Marin, M.T., Cruz, F.C., y Planeta, C.S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav.* 90, 29-35.
- Markowska, A.L., Spangler, E.L., y Ingram, D.K. (1998). Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse (SAM P8 and R1). *Physiol Behav.* 64, 15-26.
- Markram, K., Gerardy-Schahn, R., y Sandi, C. (2007a). Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience* 144, 788-796.

Bibliografía

- Markram,K., Lopez Fernandez,M.A., Abrous,D.N., y Sandi,C. (2007b). Amygdala upregulation of NCAM polysialylation induced by auditory fear conditioning is not required for memory formation, but plays a role in fear extinction. *Neurobiol.Learn.Mem.* 87, 573-582.
- Marquez,C., Nadal,R., y Armario,A. (2005). Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 30, 179-187.
- Marsden,C.A. (1990). The pharmacology of new anxiolytics acting on 5-HT neurones. *Postgrad.Med.J.* 66 *Suppl* 2, S2-S6.
- Martijena,I.D., Rodriguez Manzanares,P.A., Lacerra,C., y Molina,V.A. (2002). Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala. *Synapse* 45, 86-94.
- Martin,S.J., Grimwood,P.D., y Morris,R.G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu.Rev.Neurosci* 23, 649-711.
- Matheson,G.K., Branch,B.J., y Taylor,A.N. (1971). Effects of amygdaloid stimulation on pituitary-adrenal activity in conscious cats. *Brain Res.* 32, 151-167.
- Mathews,A. (1990). Why worry? The cognitive function of anxiety. *Behav.Res.Ther.* 28, 455-468.
- Matsubara,S., Arora,R.C., y Meltzer,H.Y. (1991). Serotonergic measures in suicide brain: 5-HT1A binding sites in frontal cortex of suicide victims. *J.Neural Transm.Gen.Sect.* 85, 181-194.
- Matsuzaki,M., Ellis-Davies,G.C., Nemoto,T., Miyashita,Y., Iino,M., y Kasai,H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat.Neurosci.* 4, 1086-1092.
- Matsuzawa,S., Suzuki,T., y Misawa,M. (2000). Ethanol, but not the anxiolytic drugs buspirone and diazepam, produces a conditioned place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 65, 281-288.
- Mayberg,H.S. (1997). Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.* 9, 471-481.
- McDonald,R.J. y White,N.M. (1995). Hippocampal and nonhippocampal contributions to place learning in rats. *Behav.Neurosci.* 109, 579-593.
- McEwen,B.S. (1979). Influences of adrenocortical hormones on pituitary and brain function. *Monogr Endocrinol.* 12, 467-492.
- McEwen,B.S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu.Rev.Neurosci.* 22, 105-122.
- McEwen,B.S. (2000). Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol.Psychiatry* 48, 721-731.
- McEwen,B.S. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol.Aging* 23, 921-939.
- McEwen,B.S. y Magarinos,A.M. (1997). Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 821, 271-284.
- McGaugh,J.L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153, 1351-1358.
- McGaugh,J.L. (1989). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annu.Rev.Neurosci* 12, 255-287.
- McGaugh,J.L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science* 287, 248-251.

Bibliografía

- McGaugh, J.L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 1-28.
- McGaugh, J.L., Cahill, L., y Roozendaal, B. (1996). Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13508-13514.
- McGaugh, J.L., Gold, P.E., van Buskirk, R., y Haycock, J. (1975). Modulating influences of hormones and catecholamines on memory storage processes. *Prog. Brain Res.* 42, 151-162.
- McGaugh, J.L. y Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 205-210.
- McGaugh, J.L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in neurosciences* 25, 456.
- McIntyre, C.K., Hatfield, T., y McGaugh, J.L. (2002). Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *Eur. J Neurosci* 16, 1223-1226.
- McKernan, M.G. y Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390, 607-611.
- McLay, R.N., Freeman, S.M., y Zadina, J.E. (1998). Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze. *Physiol Behav.* 63, 933-937.
- McLean, M. y Smith, R. (2001). Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction.* 121, 493-501.
- McNaughton, D., Hughes, C., y Clark, K. (1997). The effect of five proofreading conditions on the spelling performance of college students with learning disabilities. *J Learn. Disabil.* 30, 643-651.
- McNaughton, N. (1997). Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity—a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56, 603-611.
- McNaughton, N. (2006). The role of the subiculum within the behavioural inhibition system. *Behav. Brain Res.* 174, 232-250.
- McNaughton, N. y Gray, J.A. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J. Affect. Disord.* 61, 161-176.
- McNay, E.C., Fries, T.M., y Gold, P.E. (2000). Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 2881-2885.
- McNay, E.C. y Gold, P.E. (2002). Food for thought: fluctuations in brain extracellular glucose provide insight into the mechanisms of memory modulation. *Behav. Cogn Neurosci. Rev.* 1, 264-280.
- Meana, J.J., Barturen, F., Garro, M.A., García-Sevilla, J.A., Fontan, A., y Zarranz, J.J. (1992). Decreased density of presynaptic alpha 2-adrenoceptors in postmortem brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 58, 1896-1904.
- Mechiel, K.S. y De Boer, S.F. (2003). A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 163-175.
- Meijer, O.C. y de Kloet, E.R. (1998). Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev. Neurobiol.* 12, 1-20.
- Meijer, O.C., Topic, B., Steenbergen, P.J., Jocham, G., Huston, J.P., y Oitzl, M.S. (2005). Correlations between hypothalamus-pituitary-adrenal axis parameters depend on age and learning capacity. *Endocrinology* 146, 1372-1381.

- Melia, K.R. y Duman, R.S. (1991). Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 8382-8386.
- Meneses, A. (1999). 5-HT system and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 1111-1125.
- Merali, Z., Khan, S., Michaud, D.S., Shippy, S.A., y Anisman, H. (2004). Does amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) mediate anxiety-like behaviors? Dissociation of anxiogenic effects and CRH release. *Eur. J. Neurosci.* 20, 229-239.
- Merrill, D.A., Karim, R., Darraq, M., Chiba, A.A., y Tuszynski, M.H. (2003). Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. *J. Comp. Neurol.* 459, 201-207.
- Messier, C. (1997). Object recognition in mice: improvement of memory by glucose. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 172-175.
- Messier, C. (2004). Glucose improvement of memory: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 33-57.
- Messier, C. y Destrade, C. (1988). Improvement of memory for an operant response by post-training glucose in mice. *Behav. Brain Res.* 31, 185-191.
- Meunier, M., Bachevalier, J., Mishkin, M., y Murray, E.A. (1993). Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. *J. Neurosci.* 13, 5418-5432.
- Meyer, U., van Kampen, M., Isovich, E., Flugge, G., y Fuchs, E. (2001). Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews. *Hippocampus* 11, 329-336.
- Michels, G. y Moss, S.J. (2007). GABAA receptors: properties and trafficking. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 3-14.
- Miller, E.K. y Cohen, J.D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 167-202.
- Milner, A.D. y McIntosh, R.D. (2005). The neurological basis of visual neglect. *Curr. Opin. Neurol.* 18, 748-753.
- Milner, B., Squire, L.R., y Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.
- Mirescu, C., Peters, J.D., y Gould, E. (2004). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat. Neurosci.* 7, 841-846.
- Misane, I., Tovote, P., Meyer, M., Spiess, J., Ogren, S.O., y Stiedl, O. (2005). Time-dependent involvement of the dorsal hippocampus in trace fear conditioning in mice. *Hippocampus* 15, 418-426.
- Misslin, R., Herzog, F., Koch, B., y Ropartz, P. (1982). Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary-adrenal response in the mouse. *Psychoneuroendocrinology* 7, 217-221.
- Mitchell, D., Osborne, E.W., y O'Boyle, M.W. (1985). Habituation under stress: shocked mice show nonassociative learning in a T-maze. *Behav. Neural Biol.* 43, 212-217.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., y Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119, 887-897.
- Mocchetti, I., Spiga, G., Hayes, V.Y., Isackson, P.J., y Colangelo, A. (1996). Glucocorticoids differentially increase nerve growth factor and basic fibroblast growth factor expression in the rat brain. *J. Neurosci.* 16, 2141-2148.
- Mocchetti, I. y Wrathall, J.R. (1995). Neurotrophic factors in central nervous system trauma. *J. Neurotrauma* 12, 853-870.
- Mogensen, J., Lauritsen, K.T., Elvertorp, S., Hasman, A., Moustgaard, A., y Wortwein, G. (2004). Place learning and object recognition by rats subjected to transection of the fimbria-fornix and/or ablation of the prefrontal cortex. *Brain Res. Bull.* 63, 217-236.

- Moghaddam,B. (2002). Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol.Psychiatry* 51, 775-787.
- Moghaddam,B., Bolinao,M.L., Stein-Behrens,B., y Sapolsky,R. (1994). Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.* 655, 251-254.
- Mohapel,P., Mundt-Petersen,K., Brundin,P., y Frielingsdorf,H. (2006). Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 142, 609-613.
- Molteni,R., Fumagalli,F., Magnaghi,V., Roceri,M., Gennarelli,M., Racagni,G., Melcangi,R.C., y Riva,M.A. (2001). Modulation of fibroblast growth factor-2 by stress and corticosteroids: from developmental events to adult brain plasticity. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 37, 249-258.
- Mombereau,C., Kaupmann,K., Froestl,W., Sansig,G., van der,P.H., y Cryan,J.F. (2004). Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 29, 1050-1062.
- Montaron,M.F., Drapeau,E., Dupret,D., Kitchener,P., Aurousseau,C., Le Moal,M., Piazza,P.V., y Abrous,D.N. (2006). Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol.Aging* 27, 645-654.
- Montaron,M.F., Petry,K.G., Rodriguez,J.J., Marinelli,M., Aurousseau,C., Rougon,G., Le Moal,M., y Abrous,D.N. (1999). Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM expression in aged dentate gyrus. *Eur.J Neurosci* 11, 1479-1485.
- Morikis,D. y Lambris,J.D. (2004). Physical methods for structure, dynamics and binding in immunological research. *Trends Immunol.* 25, 700-707.
- Morris,R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J.Neurosci.Methods* 11, 47-60.
- Morris,R.G., Garrud,P., Rawlins,J.N., y O'Keefe,J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *La Nature* 297, 681-683.
- Mueller,N.K., Dolgas,C.M., y Herman,J.P. (2004). Stressor-selective role of the ventral subiculum in regulation of neuroendocrine stress responses. *Endocrinology* 145, 3763-3768.
- Muller,D., Djebbara-Hannas,Z., Jourdain,P., Vutskits,L., Durbec,P., Rougon,G., y Kiss,J.Z. (2000). Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4315-4320.
- Muller,D., Wang,C., Skibo,G., Toni,N., Cremer,H., Calaora,V., Rougon,G., y Kiss,J.Z. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 17, 413-422.
- Mumby,D.G., Gaskin,S., Glenn,M.J., Schramek,T.E., y Lehmann,H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learning & memory* 9, 49-57.
- Munck,A., Guyre,P.M., y Holbrook,N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr.Rev.* 5, 25-44.
- Murchison,C.F., Zhang,X.Y., Zhang,W.P., Ouyang,M., Lee,A., y Thomas,S.A. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117, 131-143.
- Murphy,B.L., Arnsten,A.F., Goldman-Rakic,P.S., y Roth,R.H. (1996a). Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 1325-1329.
- Murphy,E.K., Spencer,R.L., Sipe,K.J., y Herman,J.P. (2002). Decrements in nuclear glucocorticoid receptor (GR)

- protein levels and DNA binding in aged rat hippocampus. *Endocrinology* 143, 1362-1370.
- Murphy, K.J., O'Connell, A.W., y Regan, C.M. (1996b). Repetitive and transient increases in hippocampal neural cell adhesion molecule polysialylation state following multitrial spatial training. *J. Neurochem.* 67, 1268-1274.
- Murphy, K.J. y Regan, C.M. (1998). Contributions of cell adhesion molecules to altered synaptic weightings during memory consolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 73-81.
- Murphy, K.J. y Regan, C.M. (1999). Sequential training in separate paradigms impairs second task consolidation and learning-associated modulations of hippocampal NCAM polysialylation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 72, 28-38.
- Murthy, V.N., Sejnowski, T.J., y Stevens, C.F. (2000). Dynamics of dendritic calcium transients evoked by quantal release at excitatory hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 901-906.
- Nacher, J. y McEwen, B.S. (2006). The role of N-methyl-D-aspartate receptors in neurogenesis. *Hippocampus* 16, 267-270.
- Nacher, J., Pham, K., Gil-Fernandez, V., y McEwen, B.S. (2004). Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex. *Neuroscience* 126, 503-509.
- Nakao, K., Matsuyama, K., Matsuki, N., y Ikegaya, Y. (2004). Amygdala stimulation modulates hippocampal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 14270-14275.
- Neiiendam, J.L., Kohler, L.B., Christensen, C., Li, S., Pedersen, M.V., Ditlevsen, D.K., Kornum, M.K., Kiselyov, V.V., Berezin, V., y Bock, E. (2004). An NCAM-derived FGF-receptor agonist, the FGL-peptide, induces neurite outgrowth and neuronal survival in primary rat neurons. *J. Neurochem.* 91, 920-935.
- Nesse, R.M., Curtis, G.C., Thyer, B.A., McCann, D.S., Huber-Smith, M.J., y Knopf, R.F. (1985). Endocrine and cardiovascular responses during phobic anxiety. *Psychosom. Med.* 47, 320-332.
- Neumann, I.D., Wigger, A., Kromer, S., Frank, E., Landgraf, R., y Bosch, O.J. (2005). Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in a rat model of extremes in trait anxiety. *Neuroscience* 132, 867-877.
- Newcomer, J.W., Craft, S., Hershey, T., Askins, K., y Bardgett, M.E. (1994). Glucocorticoid-induced impairment in declarative memory performance in adult humans. *J. Neurosci.* 14, 2047-2053.
- Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., y Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol.* 157, 521-532.
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., y Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol* 64, 313-353.
- Nisenbaum, L.K., Zigmond, M.J., Sved, A.F., y Abercrombie, E.D. (1991). Prior exposure to chronic stress results in enhanced synthesis and release of hippocampal norepinephrine in response to a novel stressor. *J. Neurosci.* 11, 1478-1484.
- Nishio, H., Kasuga, S., Ushijima, M., y Harada, Y. (2001). Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats—sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 37-45.
- Noble, M., Albrechtsen, M., Moller, C., Lyles, J., Bock, E., Goridis, C., Watanabe, M., y Rutishauser, U. (1985). Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro. *Nature* 316, 725-728.
- Nutt, D.J. y Malizia, A.L. (2001). New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br. J. Psychiatry* 179, 390-396.

- Ohi,F., Toschi,N., Wigger,A., Henniger,M.S., y Landgraf,R. (2001). Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav.Neurosci.* 115, 429-436.
- Oitzl,M.S. y de Kloet,E.R. (1992). Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behavioral neuroscience* 106, 62-71.
- Oitzl,M.S., Fluttert,M., y de Kloet,E.R. (1994). The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticoid receptors. *European journal of neuroscience* 6, 1072-1079.
- Oitzl,M.S., Fluttert,M., Sutanto,W., y de Kloet,E.R. (1998). Continuous blockade of brain glucocorticoid receptors facilitates spatial learning and memory in rats. *Eur.J.Neurosci.* 10, 3759-3766.
- Oitzl,M.S., Reichardt,H.M., Joels,M., y de Kloet,E.R. (2001). Point mutation in the mouse glucocorticoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 12790-12795.
- Oitzl,M.S., van Haarst,A.D., Sutanto,W., y de Kloet,E.R. (1995). Corticosterone, brain mineralocorticoid receptors (MRs) and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: the Lewis rat as an example of increased central MR capacity and a hyporesponsive HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 20, 655-675.
- Okuda,S., Roozendaal,B., y McGaugh,J.L. (2004). Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 853-858.
- Okuyama,S., Chaki,S., Kawashima,N., Suzuki,Y., Ogawa,S., Nakazato,A., Kumagai,T., Okubo,T., y Tomisawa,K. (1999). Receptor binding, behavioral, and electrophysiological profiles of nonpeptide corticotropin-releasing factor subtype 1 receptor antagonists CRA1000 and CRA1001. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 289, 926-935.
- Olivier,B., van Oorschot,R., y Waldinger,M.D. (1998). Serotonin, serotonergic receptors, selective serotonin reuptake inhibitors and sexual behaviour. *Int.Clin.Psychopharmacol.* 13 Suppl 6, S9-14.
- Olsen,M., Krog,L., Edvardsen,K., Skovgaard,L.T., y Bock,E. (1993). Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane. *Biochem.J.* 295 (Pt 3), 833-840.
- Ottewiller,J.E. y Meier,A.H. (1982). Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism able to regulate adrenocortical rhythmicity in rats. *Endocrinology* 111, 1334-1338.
- Overli,O. (2007). Preface: plasticity and diversity in behavior and brain function—important raw material for natural selection? *Brain Behav.Evol.* 70, 215-217.
- Pacak,K. y Palkovits,M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr.Rev.* 22, 502-548.
- Packard,M.G. y Knowlton,B.J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu.Rev.Neurosci.* 25, 563-593.
- Pandolfo,P., Pamplona,F.A., Prediger,R.D., y Takahashi,R.N. (2007). Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Eur.J.Pharmacol.* 563, 141-148.
- Papadopoulos,G.C. y Parnavelas,J.G. (1990). Distribution and synaptic organization of serotonergic and noradrenergic axons in the lateral geniculate nucleus of the rat. *J.Comp Neurol.* 294, 345-355.
- Paratcha,G., Ledda,F., y Ibanez,C.F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113, 867-879.
- Pardon,M.C., Kendall,D.A., Perez-Diaz,F., Duxon,M.S., y Marsden,C.A. (2004). Repeated sensory contact with aggressive mice rapidly leads to an anticipatory increase in core body temperature and physical activity that precedes the onset of aversive responding. *Eur.J.Neurosci.* 20, 1033-1050.

- Paré,D. y Gaudreau,H. (1996). Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. *Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 3334-3350.
- Park,C.R., Campbell,A.M., y Diamond,D.M. (2001). Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. *Biol.Psychiatry* 50, 994-1004.
- Parks,C.L., Robinson,P.S., Sibille,E., Shenk,T., y Toth,M. (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 10734-10739.
- Paskitti,M.E., McCreary,B.J., y Herman,J.P. (2000). Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 80, 142-152.
- Patacchioli,F.R., Angelucci,L., Casolini,P., Bottone,A., Borboni,P., Lauro,R., y Marlier,L.N. (1998). Corticosterone treatment differentially affects adrenocorticoid receptors expression and binding in the hippocampus and spinal cord of the rat. *J.Mol.Neurosci.* 11, 95-103.
- Pavcovich,L.A., Cancela,L.M., Volosin,M., Molina,V.A., y Ramirez,O.A. (1990). Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. *Brain Res.Bull.* 24, 293-296.
- Pavlidis,C., Watanabe,Y., y McEwen,B.S. (1993). Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 3, 183-192.
- Paxinos,G. y Watson,C. *The rat brain stereotaxic coordinates.* 1982. Australia, Academic Press.
- Pellow,S., Chopin,P., File,S.E., y Briley,M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J.Neurosci.Methods* 14, 149-167.
- Pereira,A.C., Centurion,V., y Caputi,A.A. (2005). Contextual effects of small environments on the electric images of objects and their brain evoked responses in weakly electric fish. *J.Exp.Biol.* 208, 961-972.
- Perez-Alvarez,L., Baeza,I., Arranz,L., Marco,E.M., Borcel,E., Guaza,C., Viveros,M.P., y De la,F.M. (2005). Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging. *Dev.Comp Immunol.* 29, 965-976.
- Perlman,W.R., Webster,M.J., Herman,M.M., Kleinman,J.E., y Weickert,C.S. (2007). Age-related differences in glucocorticoid receptor mRNA levels in the human brain. *Neurobiol.Aging* 28, 447-458.
- Perrot-Sinal,T.S., Kostenuik,M.A., Ossenkopp,K.P., y Kavaliers,M. (1996). Sex differences in performance in the Morris water maze and the effects of initial nonstationary hidden platform training. *Behav.Neurosci.* 110, 1309-1320.
- Petersen,E.N., Braestrup,C., y Scheel-Kruger,J. (1985). Evidence that the anticonflict effect of midazolam in amygdala is mediated by the specific benzodiazepine receptors. *Neurosci.Lett.* 53, 285-288.
- Pezze,M.A. y Feldon,J. (2004). Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog.Neurobiol.* 74, 301-320.
- Pham,K., Nacher,J., Hof,P.R., y McEwen,B.S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur.J Neurosci* 17, 879-886.
- Phillips,R.G. y LeDoux,J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav.Neurosci.* 106, 274-285.
- Phillips,R.G. y LeDoux,J.E. (1994). Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn.Mem.* 1, 34-44.
- Pierard,C., Liscia,P., Valteau,M., Drouet,I., Chauveau,F., Huart,B., Bonneau,D., Jouanin,J.C., Beaumont,M., y Beracochea,D. (2006). Modafinil-induced modulation of working memory and plasma corticosterone in

chronically-stressed mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 83, 1-8.

- Pillai-Nair,N., Panicker,A.K., Rodriguiz,R.M., Gilmore,K.L., Demyanenko,G.P., Huang,J.Z., Wetsel,W.C., y Maness,P.F. (2005). Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. *J.Neurosci.* 25, 4659-4671.
- Pitkanen,A., Pikkarainen,M., Nurminen,N., y Ylinen,A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 911, 369-391.
- Pitman,D.L., Ottenweller,J.E., y Natelson,B.H. (1988). Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav.* 43, 47-55.
- Plomin,R., Owen,M.J., y McGuffin,P. (1994). The genetic basis of complex human behaviors. *Science* 264, 1733-1739.
- Plotsky,P.M., Kjaer,A., Sutton,S.W., Sawchenko,P.E., y Vale,W. (1991). Central activin administration modulates corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology* 128, 2520-2525.
- Pollard,I., Bassett,J.R., y Cairncross,K.D. (1976). Plasma glucocorticoid elevation and ultrastructural changes in the adenohypophysis of the male rat following prolonged exposure to stress. *Neuroendocrinology* 21, 312-330.
- Porter,N.M. y Landfield,P.W. (1998). Stress hormones and brain aging: adding injury to insult? *Nat.Neurosci* 1, 3-4.
- Potter,E., Sutton,S., Donaldson,C., Chen,R., Perrin,M., Lewis,K., Sawchenko,P.E., y Vale,W. (1994). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 8777-8781.
- Powers,C.J., McLeskey,S.W., y Wellstein,A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr.Relat Cancer* 7, 165-197.
- Pugh,C.R., Tremblay,D., Fleshner,M., y Rudy,J.W. (1997). A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. *Behavioral neuroscience* 111, 503-511.
- Quirk,G.J., Armony,J.L., y LeDoux,J.E. (1997). Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19, 613-624.
- Raadsheer,F.C., Hoogendijk,W.J., Stam,F.C., Tilders,F.J., y Swaab,D.F. (1994). Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60, 436-444.
- Radulovic,J., Ruhmann,A., Liepold,T., y Spiess,J. (1999). Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J.Neurosci.* 19, 5016-5025.
- Raff,M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature* 396, 119-122.
- Ragozzino,M.E., Pal,S.N., Unick,K., Stefani,M.R., y Gold,P.E. (1998). Modulation of hippocampal acetylcholine release and spontaneous alternation scores by intrahippocampal glucose injections. *J.Neurosci.* 18, 1595-1601.
- Ragozzino,M.E., Unick,K.E., y Gold,P.E. (1996). Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 4693-4698.
- Rainnie,D.G. (1999). Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J.Neurophysiol.* 82, 69-85.
- Rainnie,D.G., Asprodini,E.K., y Shinnick-Gallagher,P. (1991a). Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *J.Neurophysiol.* 66, 986-998.
- Rainnie,D.G., Asprodini,E.K., y Shinnick-Gallagher,P. (1991b). Inhibitory transmission in the basolateral amygdala.

- J.Neurophysiol. 66, 999-1009.
- Ramboz,S., Oosting,R., Amara,D.A., Kung,H.F., Blier,P., Mendelsohn,M., Mann,J.J., Brunner,D., y Hen,R. (1998). Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 14476-14481.
- Ramón y Cajal,S. La fine structure des centres nerveux. *Proc.R.Soc.Lond.* 55, 444-468. 1894.
- Ramos,A., Berton,O., Mormede,P., y Chaouloff,F. (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav.Brain Res.* 85, 57-69.
- Rao,Y., Zhao,X., y Siu,C.H. (1994). Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM. Evidence for isologous interaction. *J.Biol.Chem.* 269, 27540-27548.
- Rapp,P.R. y Amaral,D.G. (1992). Individual differences in the cognitive and neurobiological consequences of normal aging. *Trends Neurosci* 15, 340-345.
- Rapp,P.R., Stack,E.C., y Gallagher,M. (1999). Morphometric studies of the aged hippocampus: I. Volumetric analysis in behaviorally characterized rats. *J Comp Neurol.* 403, 459-470.
- Rashidy-Pour,A. (2001). ATP-sensitive potassium channels mediate the effects of a peripheral injection of glucose on memory storage in an inhibitory avoidance task. *Behav.Brain Res.* 126, 43-48.
- Rasmussen,K. y Jacobs,B.L. (1986). Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cat. II. Conditioning and pharmacologic studies. *Brain Res.* 371, 335-344.
- Ratka,A., Sutanto,W., Bloemers,M., y de Kloet,E.R. (1989). On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 50, 117-123.
- Raz,N., Williamson,A., Gunning-Dixon,F., Head,D., y Acker,J.D. (2000). Neuroanatomical and cognitive correlates of adult age differences in acquisition of a perceptual-motor skill. *Microsc.Res.Tech.* 51, 85-93.
- Reagan,L.P. y McEwen,B.S. (1997). Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem.Neuroanat.* 13, 149-167.
- Redgate,E.S. y Fahringer,E.E. (1973). A comparison of the pituitary adrenal activity elicited by electrical stimulation of preoptic, amygdaloid and hypothalamic sites in the rat brain. *Neuroendocrinology* 12, 334-343.
- Redmond,D.E., Jr. (1986). The possible role of locus coeruleus noradrenergic activity in anxiety-panic. *Clin.Neuropharmacol.* 9 Suppl 4, 40-42.
- Redmond,D.E., Jr. y Huang,Y.H. (1979). Current concepts. II. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci.* 25, 2149-2162.
- Regan,C.M. y Fox,G.B. (1995). Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem.Res.* 20, 593-598.
- Ressler,K.J. y Nemeroff,C.B. (2000). Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress.Anxiety.* 12 Suppl 1, 2-19.
- Reul,J.M. y de Kloet,E.R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505-2511.
- Reuss,B. y Bohlen und,H.O. (2003). Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 313, 139-157.
- Ribeiro,R.L., Andreatini,R., Wolfman,C., Viola,H., Medina,J.H., y da Cunha,C. (1999). The "anxiety state" and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiol.Learn.Mem.* 72, 78-94.

Bibliografía

- Risbrough,V.B. y Stein,M.B. (2006). Role of corticotropin releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective. *Horm.Behav.* 50, 550-561.
- Riva,M.A., Fumagalli,F., Blom,J.M., Donati,E., y Racagni,G. (1995). Adrenalectomy reduces FGF-1 and FGF-2 gene expression in specific rat brain regions and differently affects their induction by seizures. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 34, 190-196.
- Riva,M.A., Molteni,R., y Racagni,G. (1998). Differential regulation of FGF-2 and FGFR-1 in rat cortical astrocytes by dexamethasone and isoproterenol. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 57, 38-45.
- Rivier,C. y Vale,W. (1983). Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305, 325-327.
- Rivier,C.L. y Plotsky,P.M. (1986). Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu.Rev.Physiol* 48, 475-494.
- Robbins,T.W. y Roberts,A.C. (2007). Differential regulation of fronto-executive function by the monoamines and acetylcholine. *Cereb.Cortex* 17 *Suppl* 1, i151-i160.
- Robertson,L.T. (2002). Memory and the brain. *J.Dent.Educ.* 66, 30-42.
- Rodgers,R.J. y Cole,J.C. (1993). Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol Behav.* 54, 729-736.
- Rodriguez Echandia,E.L., Gonzalez,A.S., Cabrera,R., y Fracchia,L.N. (1988). A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress. *Physiol Behav.* 43, 789-795.
- Ronn,L.C., Bock,E., Linnemann,D., y Jahnsen,H. (1995). NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res.* 677, 145-151.
- Rønn,L.C., Doherty,P., Holm,A., Berezin,V., y Bock,E. (2000). Neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule requires fibroblast growth factor receptor activation. *Journal of neurochemistry* 75, 665-671.
- Ronn,L.C., Hartz,B.P., y Bock,E. (1998). The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp.Gerontol.* 33, 853-864.
- Roosendaal,B. (2000). 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 25, 213-238.
- Roosendaal,B. (2003). Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 27, 1213-1223.
- Roosendaal,B., Cami,O., y McGaugh,J.L. (1996). Adrenocortical suppression blocks the memory-enhancing effects of amphetamine and epinephrine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 1429-1433.
- Roosendaal,B., Hahn,E.L., Nathan,S.V., de Quervain,D.J., y McGaugh,J.L. (2004). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J.Neurosci.* 24, 8161-8169.
- Roosendaal,B. y McGaugh,J.L. (1997). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *European journal of neuroscience* 9, 76-83.
- Roosendaal,B., Okuda,S., Van der Zee,E.A., y McGaugh,J.L. (2006). Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 6741-6746.
- Roosendaal,B., Williams,C.L., y McGaugh,J.L. (1999). Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the

- solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. *Eur.J.Neurosci.* 11, 1317-1323.
- Rougon,G. (1993). Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur.J.Cell Biol.* 61, 197-207.
- Roullet,P., Mileusnic,R., Rose,S.P., y Sara,S.J. (1997). Neural cell adhesion molecules play a role in rat memory formation in appetitive as well as aversive tasks. *Neuroreport* 8, 1907-1911.
- Rozeboom,A.M., Akil,H., y Seasholtz,A.F. (2007). Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 4688-4693.
- Rudy,J.W. y Pugh,C.R. (1996). A comparison of contextual and generalized auditory-cue fear conditioning: evidence for similar memory processes. *Behav.Neurosci.* 110, 1299-1308.
- Rushworth,M.F., Walton,M.E., Kennerley,S.W., y Bannerman,D.M. (2004). Action sets and decisions in the medial frontal cortex. *Trends Cogn Sci.* 8, 410-417.
- Rutishauser,U. y Landmesser,L. (1996). Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* 19, 422-427.
- Saar,D., Grossman,Y., y Barkai,E. (1998). Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *Eur.J Neurosci* 10, 1518-1523.
- Saffell,J.L., Williams,E.J., Mason,I.J., Walsh,F.S., y Doherty,P. (1997). Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18, 231-242.
- Sajdyk,T.J. y Shekhar,A. (1997). Excitatory amino acid receptors in the basolateral amygdala regulate anxiety responses in the social interaction test. *Brain Res.* 764, 262-264.
- Sakaguchi,A., LeDoux,J.E., Sved,A.F., y Reis,D.J. (1984). Strain difference in fear between spontaneously hypertensive and normotensive rats is mediated by adrenal cortical hormones. *Neurosci.Lett.* 46, 59-64.
- Salik,E., Ercan,F., Sirvanci,S., Cetinel,S., Onat,F., y San,T. (2005). Effect of aging on the distribution of basic fibroblast growth factor immunoreactive cells in the rat hippocampus. *Brain Res.Bull.* 64, 409-415.
- Salome,N., Salchner,P., Viltart,O., Sequeira,H., Wigger,A., Landgraf,R., y Singewald,N. (2004). Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol.Psychiatry* 55, 715-723.
- Samson,R.D. y Pare,D. (2005). Activity-dependent synaptic plasticity in the central nucleus of the amygdala. *J.Neurosci.* 25, 1847-1855.
- Sanders,S.K. y Shekhar,A. (1995). Anxiolytic effects of chlordiazepoxide blocked by injection of GABAA and benzodiazepine receptor antagonists in the region of the anterior basolateral amygdala of rats. *Biol.Psychiatry* 37, 473-476.
- Sandi,C. (2003). [Glucocorticoid involvement in memory consolidation]. *Rev.Neurol.* 37, 843-848.
- Sandi,C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat.Rev.Neurosci* 5, 917-930.
- Sandi,C. y Bisaz,R. (2007). A model for the involvement of neural cell adhesion molecules in stress-related mood disorders. *Neuroendocrinology* 85, 158-176.
- Sandi,C. y Loscertales,M. (1999). Opposite effects on NCAM expression in the rat frontal cortex induced by acute vs. chronic corticosterone treatments. *Brain Res.* 828, 127-134.
- Sandi,C., Loscertales,M., y Guaza,C. (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur.J.Neurosci.* 9, 637-642.

Bibliografía

- Sandi,C., Merino,J.J., Cordero,M.I., Krut,N.D., Murphy,K.J., y Regan,C.M. (2003a). Modulation of hippocampal NCAM polysialylation and spatial memory consolidation by fear conditioning. *Biol.Psychiatry* 54, 599-607.
- Sandi,C., Merino,J.J., Cordero,M.I., Touyarot,K., y Venero,C. (2001). Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience* 102, 329-339.
- Sandi,C. y Rose,S.P. (1994a). Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. *Eur.J.Neurosci.* 6, 1292-1297.
- Sandi,C. y Rose,S.P. (1994b). Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm. *Brain Res.* 647, 106-112.
- Sandi,C. y Touyarot,K. (2006). Mid-life stress and cognitive deficits during early aging in rats: individual differences and hippocampal correlates. *Neurobiol.Aging* 27, 128-140.
- Sandi,C., Venero,C., y Guaza,C. (1996). Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur.J.Neurosci.* 8, 794-800.
- Sandi,C., Davies,H.A., Cordero,M.I., Rodriguez,J.J., Popov,V.I., y Stewart,M.G. (2003b). Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *Eur J Neurosci* 17, 2447-2456.
- Sandi,C., Merino,J.J., Cordero,M.I., Krut,N.D., Murphy,K.J., y Regan,C.M. (2003c). Modulation of hippocampal NCAM polysialylation and spatial memory consolidation by fear conditioning. *Biological psychiatry* 54, 599-607.
- Sandi,C. y Rose,S.P.R. (1997). Training-dependent biphasic effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance task in chicks. *Psychopharmacology* 133, 152-160.
- Sapolsky,R.M. (1985). A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J Neurosci* 5, 1228-1232.
- Sapolsky,R.M. (1990). Glucocorticoids, hippocampal damage and the glutamatergic synapse. *Prog.Brain Res.* 86, 13-23.
- Sapolsky,R.M. (1999). Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp.Gerontol.* 34, 721-732.
- Sapolsky,R.M. (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch.Gen.Psychiatry* 57, 925-935.
- Sapolsky,R.M. y Altmann,J. (1991). Incidence of hypercortisolism and dexamethasone resistance increases with age among wild baboons. *Biol.Psychiatry* 30, 1008-1016.
- Sapolsky,R.M., Krey,L.C., y McEwen,B.S. (1984a). Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 6174-6177.
- Sapolsky,R.M., Krey,L.C., y McEwen,B.S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr.Rev.* 7, 284-301.
- Sapolsky,R.M., Krey,L.C., McEwen,B.S., y Rainbow,T.C. (1984b). Do vasopressin-related peptides induce hippocampal corticosterone receptors? Implications for aging. *J.Neurosci.* 4, 1479-1485.
- Sapolsky,R.M., Romero,L.M., y Munck,A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr.Rev.* 21, 55-89.
- Sarnyai,Z., Sibille,E.L., Pavlides,C., Fenster,R.J., McEwen,B.S., y Toth,M. (2000). Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97, 14731-14736.

- Sawchenko,P.E., Li,H.Y., y Ericsson,A. (2000). Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog.Brain Res.* 122, 61-78.
- Schildkraut,J.J., Schatzberg,A.F., Samson,J.A., Rosenbaum,A., y Bowden,C.L. (1992). Norepinephrine output and metabolism in depressed patients during antidepressant treatments. *Clin.Neuropharmacol.* 15 Suppl 1 Pt A, 323A-324A.
- Schmid,R.S., Graff,R.D., Schaller,M.D., Chen,S., Schachner,M., Hemperly,J.J., y Maness,P.F. (1999). NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol.* 38, 542-558.
- Schmidt,M.V., Sterlemann,V., Ganea,K., Liebl,C., Alam,S., Harbich,D., Greetfeld,M., Uhr,M., Holsboer,F., y Muller,M.B. (2007). Persistent neuroendocrine and behavioral effects of a novel, etiologically relevant mouse paradigm for chronic social stress during adolescence. *Psychoneuroendocrinology* 32, 417-429.
- Schmitt,U., Luddens,H., y Hiemke,C. (2002). Anxiolytic-like effects of acute and chronic GABA transporter inhibition in rats. *J.Neural Transm.* 109, 871-880.
- Scholey,A.B., Mileusnic,R., Schachner,M., y Rose,S.P. (1995). A role for a chicken homolog of the neural cell adhesion molecule L1 in consolidation of memory for a passive avoidance task in the chick. *Learn.Mem.* 2, 17-25.
- Scholey,A.B., Rose,S.P., Zamani,M.R., Bock,E., y Schachner,M. (1993). A role for the neural cell adhesion molecule in a late, consolidating phase of glycoprotein synthesis six hours following passive avoidance training of the young chick. *Neuroscience* 55, 499-509.
- Schuster,T., Krug,M., Stalder,M., Hackel,N., Gerardy-Schahn,R., y Schachner,M. (2001). Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J.Neurobiol.* 49, 142-158.
- Secher,T., Novitskaia,V., Berezin,V., Bock,E., Glenthøj,B., y Klementiev,B. (2006). A neural cell adhesion molecule-derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGL-peptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention. *Neuroscience* 141, 1289-1299.
- Seidenbecher,T., Laxmi,T.R., Stork,O., y Pape,H.C. (2003). Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301, 846-850.
- Seki,T. y Arai,Y. (1991). The persistent expression of a highly polysialylated NCAM in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci.Res.* 12, 503-513.
- Seki,T. y Arai,Y. (1995). Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6, 2479-2482.
- Selden,N.R., Everitt,B.J., Jarrard,L.E., y Robbins,T.W. (1991). Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42, 335-350.
- Sesack,S.R., Deutch,A.Y., Roth,R.H., y Bunney,B.S. (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J.Comp Neurol.* 290, 213-242.
- Seyle,H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* , 132-138. 1936.
- Shalev,U., Feldon,J., y Weiner,I. (1998). Latent inhibition is disrupted by acute and repeated administration of corticosterone. *Int.J Neuropsychopharmacol.* 1, 103-113.
- Shapiro,K.L. y Lim,A. (1989). The impact of anxiety on visual attention to central and peripheral events. *Behav.Res.Ther.* 27, 345-351.

- Shekhar,A., Katner,J.S., Sajdyk,T.J., y Kohl,R.R. (2002). Role of norepinephrine in the dorsomedial hypothalamic panic response: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 71, 493-500.
- Sheng,M. y Kim,M.J. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298, 776-780.
- Shepard,J.D., Barron,K.W., y Myers,D.A. (2000). Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Res.* 861, 288-295.
- Sherif,F.M. y Ahmed,S.S. (1995). Basic aspects of GABA-transaminase in neuropsychiatric disorders. *Clin.Biochem.* 28, 145-154.
- Sherman,J.E. y Kalin,N.H. (1987). The effects of ICV-CRH on novelty-induced behavior. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 26, 699-703.
- Sherrington,C.S. The integrative action of the nervous system. 1906. New Haven, New Jersey, Yale Univ. Press.
- Shi,C. y Davis,M. (1999). Pain pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: lesion studies. *J.Neurosci.* 19, 420-430.
- Shimizu,N., Take,S., Hori,T., y Oomura,Y. (1992). In vivo measurement of hypothalamic serotonin release by intracerebral microdialysis: significant enhancement by immobilization stress in rats. *Brain Res.Bull.* 28, 727-734.
- Shors,T.J., Miesegaes,G., Beylin,A., Zhao,M., Rydel,T., y Gould,E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-376.
- Sibille,E., Pavlides,C., Benke,D., y Toth,M. (2000). Genetic inactivation of the Serotonin(1A) receptor in mice results in downregulation of major GABA(A) receptor alpha subunits, reduction of GABA(A) receptor binding, and benzodiazepine-resistant anxiety. *J.Neurosci.* 20, 2758-2765.
- Sieghart,W. (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol.Rev.* 47, 181-234.
- Siegler,I.C., Zonderman,A.B., Barefoot,J.C., Williams,R.B., Jr., Costa,P.T., Jr., y McCrae,R.R. (1990). Predicting personality in adulthood from college MMPI scores: implications for follow-up studies in psychosomatic medicine. *Psychosom.Med.* 52, 644-652.
- Skibo,G.G., Lushnikova,I.V., Voronin,K.Y., Dmitrieva,O., Novikova,T., Klementiev,B., Vaudano,E., Berezin,V.A., y Bock,E. (2005). A synthetic NCAM-derived peptide, FGL, protects hippocampal neurons from ischemic insult both in vitro and in vivo. *Eur.J Neurosci* 22, 1589-1596.
- Skutella,T., Probst,J.C., Renner,U., Holsboer,F., y Behl,C. (1998). Corticotropin-releasing hormone receptor (type I) antisense targeting reduces anxiety. *Neuroscience* 85, 795-805.
- Smith,G.W., Aubry,J.M., Dellu,F., Contarino,A., Bilezikjian,L.M., Gold,L.H., Chen,R., Marchuk,Y., Hauser,C., Bentley,C.A., Sawchenko,P.E., Koob,G.F., Vale,W., y Lee,K.F. (1998). Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20, 1093-1102.
- Smith,M.A., Makino,S., Kvetnansky,R., y Post,R.M. (1995). Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 771, 234-239.
- Smith,T.D., Adams,M.M., Gallagher,M., Morrison,J.H., y Rapp,P.R. (2000). Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* 20, 6587-6593.
- Smoller,J.W., Acierno,J.S., Jr., Rosenbaum,J.F., Biederman,J., Pollack,M.H., Meminger,S., Pava,J.A., Chadwick,L.H., White,C., Bulzacchelli,M., y Slaugenhaupt,S.A. (2001). Targeted genome screen of panic disorder and anxiety disorder proneness using homology to murine QTL regions. *Am.J.Med.Genet.* 105, 195-206.

Bibliografia

- Smoller, J.W., Rosenbaum, J.F., Biederman, J., Kennedy, J., Dai, D., Racette, S.R., Laird, N.M., Kagan, J., Snidman, N., Hirshfeld-Becker, D., Tsuang, M.T., Sklar, P.B., y Slaughter, S.A. (2003). Association of a genetic marker at the corticotropin-releasing hormone locus with behavioral inhibition. *Biol. Psychiatry* 54, 1376-1381.
- Smythe, J.W., Bhatnagar, S., Murphy, D., Timothy, C., y Costall, B. (1998). The effects of intrahippocampal scopolamine infusions on anxiety in rats as measured by the black-white box test. *Brain Res. Bull.* 45, 89-93.
- Smythe, J.W., Murphy, D., Bhatnagar, S., Timothy, C., y Costall, B. (1996). Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 57-63.
- Smythe, J.W., Murphy, D., Timothy, C., y Costall, B. (1997). Hippocampal mineralocorticoid, but not glucocorticoid, receptors modulate anxiety-like behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56, 507-513.
- Snyder, J.S., Hong, N.S., McDonald, R.J., y Wojtowicz, J.M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130, 843-852.
- Sousa, N., A.O.F.H.F.P.-B.M.M.M.D. (1998). Maintenance of hippocampal cell numbers in young and aged rats submitted to chronic unpredictable stress. Comparison with the effects of corticosterone treatment. *Stress* 2, 237-259.
- Sousa, N., Lukoyanov, N.V., Madeira, M.D., Almeida, O.F.X., y Paula-Barbosa, M.M. (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97, 253-266.
- Spencer, R.L., Young, E.A., Choo, P.H., y McEwen, B.S. (1990). Adrenal steroid type I and type II receptor binding: estimates of in vivo receptor number, occupancy, and activation with varying level of steroid. *Brain Res.* 514, 37-48.
- Squire, L.R. *Memory and brain.* 1987. New York, Oxford University Press.
- Squire, L.R. y Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science* 253, 1380-1386.
- Stanford, S.C. (1995). Central noradrenergic neurones and stress. *Pharmacol. Ther.* 68, 297-42.
- Stanton, P.K. (1996). LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus* 6, 35-42.
- Staubli, U., Fraser, D., Faraday, R., y Lynch, G. (1987). Olfaction and the "data" memory system in rats. *Behav. Neurosci.* 101, 757-765.
- Stefani, M.R., Nicholson, G.M., y Gold, P.E. (1999). ATP-sensitive potassium channel blockade enhances spontaneous alternation performance in the rat: a potential mechanism for glucose-mediated memory enhancement. *Neuroscience* 93, 557-563.
- Stein, M.B., Jang, K.L., Taylor, S., Vernon, P.A., y Livesley, W.J. (2002). Genetic and environmental influences on trauma exposure and posttraumatic stress disorder symptoms: a twin study. *Am. J. Psychiatry* 159, 1675-1681.
- Stein, M.B., Tancer, M.E., y Uhde, T.W. (1992). Heart rate and plasma norepinephrine responsivity to orthostatic challenge in anxiety disorders. Comparison of patients with panic disorder and social phobia and normal control subjects. *Arch. Gen. Psychiatry* 49, 311-317.
- Stenzel-Poore, M.P., Heinrichs, S.C., Rivest, S., Koob, G.F., y Vale, W.W. (1994). Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J. Neurosci.* 14, 2579-2584.
- Sternberg, D.B., Martinez, J.L., Jr., Gold, P.E., y McGaugh, J.L. (1985). Age-related memory deficits in rats and mice: enhancement with peripheral injections of epinephrine. *Behav. Neural Biol.* 44, 213-220.
- Stewart, M.G., Davies, H.A., Sandi, C., Kraev, I.V., Rogachevsky, V.V., Peddie, C.J., Rodriguez, J.J., Cordero, M.I., Donohue, H.S., Gabbott, P.L., y Popov, V.I. (2005). Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of

rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience* 131, 43-54.

- Stone, E.A. (1983). Adaptation to stress and brain noradrenergic receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7, 503-509.
- Stoppel, C., Albrecht, A., Pape, H.C., y Stork, O. (2006). Genes and neurons: molecular insights to fear and anxiety. *Genes Brain Behav.* 5 Suppl 2, 34-47.
- Stork, O., Ji, F.Y., Kaneko, K., Stork, S., Yoshinobu, Y., Moriya, T., Shibata, S., y Obata, K. (2000a). Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain Res.* 865, 45-58.
- Stork, O., Welzl, H., Wolfer, D., Schuster, T., Mantei, N., Stork, S., Hoyer, D., Lipp, H., Obata, K., y Schachner, M. (2000b). Recovery of emotional behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM) null mutant mice through transgenic expression of NCAM180. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3291-3306.
- Stork, O., Welzl, H., Wotjak, C.T., Hoyer, D., Delling, M., Cremer, H., y Schachner, M. (1999). Anxiety and increased 5-HT1A receptor response in NCAM null mutant mice. *J. Neurobiol.* 40, 343-355.
- Stork, O., Yamanaka, H., Stork, S., Kume, N., y Obata, K. (2003). Altered conditioned fear behavior in glutamate decarboxylase 65 null mutant mice. *Genes Brain Behav.* 2, 65-70.
- Sugaya, K., Chouinard, M., Greene, R., Robbins, M., Personett, D., Kent, C., Gallagher, M., y McKinney, M. (1996). Molecular indices of neuronal and glial plasticity in the hippocampal formation in a rodent model of age-induced spatial learning impairment. *J. Neurosci.* 16, 3427-3443.
- Sullivan, R.M. y Gratton, A. (1999). Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J. Neurosci.* 19, 2834-2840.
- Summers, C.H., Larson, E.T., Ronan, P.J., Hofmann, P.M., Emerson, A.J., y Renner, K.J. (2000). Serotonergic responses to corticosterone and testosterone in the limbic system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117, 151-159.
- Sutton, R.E., Koob, G.F., Le Moal, M., Rivier, J., y Vale, W. (1982). Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature* 297, 331-333.
- Taghzouti, K., Louilot, A., Herman, J.P., Le Moal, M., y Simon, H. (1985). Alternation behavior, spatial discrimination, and reversal disturbances following 6-hydroxydopamine lesions in the nucleus accumbens of the rat. *Behav. Neural Biol.* 44, 354-363.
- Takagishi, M. y Chiba, T. (1991). Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res.* 566, 26-39.
- Takahashi, L.K. (1996). Glucocorticoids and the hippocampus. Developmental interactions facilitating the expression of behavioral inhibition. *Mol. Neurobiol.* 13, 213-226.
- Takahashi, L.K. (2001). Role of CRF(1) and CRF(2) receptors in fear and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 627-636.
- Talley, C.E., Kahn, S., Alexander, L.J., y Gold, P.E. (2000). Epinephrine fails to enhance performance of food-deprived rats on a delayed spontaneous alternation task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 73, 79-86.
- Tang, J., Rutishauser, U., y Landmesser, L. (1994). Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron* 13, 405-414.
- Thiel, C.M., Huston, J.P., y Schwarting, R.K. (1998). Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85, 1253-1262.
- Thiel, C.M. y Schwarting, R.K. (2001). Dopaminergic lateralisation in the forebrain: relations to behavioural asymmetries and anxiety in male Wistar rats. *Neuropsychobiology* 43, 192-199.

- Thrivikraman,K.V., Nemeroff,C.B., y Plotsky,P.M. (2000). Sensitivity to glucocorticoid-mediated fast-feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is dependent upon stressor specific neurocircuitry. *Brain Res.* 870, 87-101.
- Timpl,P., Spanagel,R., Sillaber,I., Kresse,A., Reul,J.M., Stalla,G.K., Blanquet,V., Steckler,T., Holsboer,F., y Wurst,W. (1998). Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat.Genet.* 19, 162-166.
- Todorovic,C., Radulovic,J., Jahn,O., Radulovic,M., Sherrin,T., Hippel,C., y Spiess,J. (2007). Differential activation of CRF receptor subtypes removes stress-induced memory deficit and anxiety. *Eur.J.Neurosci.* 25, 3385-3397.
- Torras-Garcia,M., Costa-Miserachs,D., Portell-Cortes,I., y Morgado-Bernal,I. (1998). Posttraining epinephrine and memory consolidation in rats with different basic learning capacities. The role of the stria terminalis. *Exp.Brain Res.* 121, 20-28.
- Touyarot,K. y Sandi,C. (2002). Chronic restraint stress induces an isoform-specific regulation on the neural cell adhesion molecule in the hippocampus. *Neural Plast.* 9, 147-159.
- Touyarot,K., Venero,C., y Sandi,C. (2004). Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 29, 290-305.
- Trachtenberg,J.T., Chen,B.E., Knott,G.W., Feng,G., Sanes,J.R., Welker,E., y Svoboda,K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788-794.
- Treit,D., Aujla,H., y Menard,J. (1998). Does the bed nucleus of the stria terminalis mediate fear behaviors? *Behav.Neurosci.* 112, 379-386.
- Turner,C.A., Akil,H., Watson,S.J., y Evans,S.J. (2006). The fibroblast growth factor system and mood disorders. *Biol.Psychiatry* 59, 1128-1135.
- Uhde,T.W., Boulenger,J.P., Post,R.M., Siever,L.J., Vittone,B.J., Jimerson,D.C., y Roy-Byrne,P.P. (1984). Fear and anxiety: relationship to noradrenergic function. *Psychopathology* 17 Suppl 3, 8-23.
- Umhau,J.C., Petrulis,S.G., Diaz,R., Rawlings,R., y George,D.T. (2003). Blood glucose is correlated with cerebrospinal fluid neurotransmitter metabolites. *Neuroendocrinology* 78, 339-343.
- Uno,H., Lohmiller,L., Thieme,C., Kemnitz,J.W., Engle,M.J., Roecker,E.B., y Farrell,P.M. (1990). Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 53, 157-167.
- Uno,H., Tarara,R., Else,J.G., Suleman,M.A., y Sapolsky,R.M. (1989). Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J Neurosci* 9, 1705-1711.
- Vale,W., Spiess,J., Rivier,C., y Rivier,J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394-1397.
- Valentino,R.J., Foote,S.L., y Aston-Jones,G. (1983). Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res.* 270, 363-367.
- Valentino,R.J., Foote,S.L., y Page,M.E. (1993). The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 697, 173-188.
- Valentino,R.J. y Wehby,R.G. (1988). Corticotropin-releasing factor: evidence for a neurotransmitter role in the locus ceruleus during hemodynamic stress. *Neuroendocrinology* 48, 674-677.
- Vallée,M., Mayo,W., Dellu,F., y Le Moal,M. (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: Correlation with stress-induced corticosterone secretion. *Journal of Neuroscience* 17, 2626-2636.

- Van Bockstaele, E.J., Bajic, D., Proudfit, H., y Valentino, R.J. (2001). Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiol Behav.* 73, 273-283.
- Van de Kar, L.D. y Blair, M.L. (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 20, 1-48.
- Van de Kar, L.D., Piechowski, R.A., Rittenhouse, P.A., y Gray, T.S. (1991). Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology* 54, 89-95.
- van den Berg, D.T., de Kloet, E.R., van Dijken, H.H., y de Jong, W. (1989). Brain corticosteroid receptors and regulation of arterial blood pressure. *J.Hypertens. Suppl* 7, S202-S203.
- Van der Borght, K., Wallinga, A.E., Luiten, P.G., Eggen, B.J., y Van der Zee, E.A. (2005). Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis. *Behav. Neurosci* 119, 926-932.
- Van Eekelen, J.A. y de Kloet, E.R. (1992). Co-localization of brain corticosteroid receptors in the rat hippocampus. *Prog.Histochem.Cytochem.* 26, 250-258.
- Van Eekelen, J.A., Rots, N.Y., Sutanto, W., Oitzl, M.S., y de Kloet, E.R. (1991). Brain corticosteroid receptor gene expression and neuroendocrine dynamics during aging. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 40, 679-683.
- van Vliet, I.M., Westenberg, H.G., y Den Boer, J.A. (1996). Effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist flesinoxan in panic disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 127, 174-180.
- Varea, E., Castillo-Gomez, E., Gomez-Climent, M.A., Guirado, R., Blasco-Ibanez, J.M., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F.J., y Nacher, J. (2007). Differential evolution of PSA-NCAM expression during aging of the rat telencephalon. *Neurobiol.Aging*.
- Varea, E., Nacher, J., Blasco-Ibanez, J.M., Gomez-Climent, M.A., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., y Martinez-Guijarro, F.J. (2005). PSA-NCAM expression in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 136, 435-443.
- Veenema, A.H., Koolhaas, J.M., y de Kloet, E.R. (2004). Basal and stress-induced differences in HPA axis, 5-HT responsiveness, and hippocampal cell proliferation in two mouse lines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1018, 255-265.
- Veenema, A.H., Torner, L., Blume, A., Beiderbeck, D.I., y Neumann, I.D. (2007). Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Horm.Behav.* 51, 11-19.
- Venero, C. y Borrell, J. (1999). Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur.J Neurosci* 11, 2465-2473.
- Venero, C., Herrero, A.I., Touyarot, K., Cambon, K., Lopez-Fernandez, M.A., Berezin, V., Bock, E., y Sandi, C. (2006). Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory. *Eur.J Neurosci* 23, 1585-1595.
- Venero, C., Tilling, T., Hermans-Borgmeyer, I., Herrero, A.I., Schachner, M., y Sandi, C. (2004). Water maze learning and forebrain mRNA expression of the neural cell adhesion molecule L1. *J.Neurosci.Res.* 75, 172-181.
- Venero, C., Tilling, T., Hermans-Borgmeyer, I., Schmidt, R., Schachner, M., y Sandi, C. (2002). Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neuroscience* 115, 1211-1219.
- Vernadakis, A. (1996). Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog.Neurobiol.* 49, 185-214.
- Vingerhoets, A.J. (1985). The role of the parasympathetic division of the autonomic nervous system in stress and the emotions. *Int.J.Psychosom.* 32, 28-34.

- Vinogradova,O.S. (2001). Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* 11, 578-598.
- Vollmann-Honsdorf,G.K., Flugge,G., y Fuchs,E. (1997). Chronic psychosocial stress does not affect the number of pyramidal neurons in tree shrew hippocampus. *Neurosci Lett.* 233, 121-124.
- Vyas,A. y Chattarji,S. (2004). Modulation of different states of anxiety-like behavior by chronic stress. *Behav.Neurosci.* 118, 1450-1454.
- Vyas,A., Jadhav,S., y Chattarji,S. (2006). Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience* 143, 387-393.
- Vyas,A., Mitra,R., Shankaranarayana Rao,B.S., y Chattarji,S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22, 6810-6818.
- Walker,D.L., Toufexis,D.J., y Davis,M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur.J.Pharmacol.* 463, 199-216.
- Wallace,M., Frankfurt,M., Arellanos,A., Inagaki,T., y Luine,V. (2007). Impaired recognition memory and decreased prefrontal cortex spine density in aged female rats. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1097, 54-57.
- Walsh,F.S. y Doherty,P. (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 13, 425-456.
- Wati,H., Kudo,K., Qiao,C., Kuroki,T., y Kanba,S. (2006). A decreased survival of proliferated cells in the hippocampus is associated with a decline in spatial memory in aged rats. *Neurosci Lett.* 399, 171-174.
- Watson,G.S. y Craft,S. (2004). Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *Eur.J.Pharmacol.* 490, 97-113.
- Webster,J.C. y Cidlowski,J.A. (1999). Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. *Trends Endocrinol.Metab* 10, 396-402.
- Wei,Q., Hebda-Bauer,E.K., Pletsch,A., Luo,J., Hoversten,M.T., Osetek,A.J., Evans,S.J., Watson,S.J., Seasholtz,A.F., y Akil,H. (2007). Overexpressing the glucocorticoid receptor in forebrain causes an aging-like neuroendocrine phenotype and mild cognitive dysfunction. *J.Neurosci.* 27, 8836-8844.
- Weiner,I. y Feldon,J. (1997). The switching model of latent inhibition: an update of neural substrates. *Behavioural brain research* 88, 11-25.
- Weinstock,M. (2001). Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog.Neurobiol.* 65, 427-451.
- Weiss,J.M., Bailey,W.H., Pohorecky,L.A., Korzeniowski,D., y Grillione,G. (1980). Stress-induced depression of motor activity correlates with regional changes in brain norepinephrine but not in dopamine. *Neurochem.Res.* 5, 9-22.
- Wellman,C.L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J.Neurobiol.* 49, 245-253.
- Wellman,C.L., Izquierdo,A., Garrett,J.E., Martin,K.P., Carroll,J., Millstein,R., Lesch,K.P., Murphy,D.L., y Holmes,A. (2007). Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice. *J.Neurosci.* 27, 684-691.
- Whitnall,M.H., Kiss,A., y Aguilera,G. (1993). Contrasting effects of central alpha-1-adrenoreceptor activation on stress-responsive and stress-nonresponsive subpopulations of corticotropin-releasing hormone neurosecretory cells in the rat. *Neuroendocrinology* 58, 42-48.

Bibliografía

- Wigger,A., Sanchez,M.M., Mathys,K.C., Ebner,K., Frank,E., Liu,D., Kresse,A., Neumann,I.D., Holsboer,F., Plotsky,P.M., y Landgraf,R. (2004). Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. *Neuropsychopharmacology* 29, 1-14.
- Williams,A.F. y Barclay,A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 6, 381-405.
- Williams,E.J., Furness,J., Walsh,F.S., y Doherty,P. (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13, 583-594.
- Willner,P. (1984). Cognitive functioning in depression: a review of theory and research. *Psychol.Med.* 14, 807-823.
- Wilson,I.A., Ikonen,S., Gallagher,M., Eichenbaum,H., y Tanila,H. (2005). Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. *J Neurosci* 25, 6877-6886.
- Wilson,I.A., Ikonen,S., McMahan,R.W., Gallagher,M., Eichenbaum,H., y Tanila,H. (2003). Place cell rigidity correlates with impaired spatial learning in aged rats. *Neurobiol.Aging* 24, 297-305.
- Wissink,S., Meijer,O., Pearce,D., van Der,B.B., y Der Saag,P.T. (2000). Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids. *J.Biol.Chem.* 275, 1321-1326.
- Wolkowitz,O., Sutton,M., Koulou,M., Labarca,R., Wilkinson,L., Doran,A., Hauger,R., Pickar,D., y Crawley,J. (1986). Chronic corticosterone administration in rats: behavioral and biochemical evidence of increased central dopaminergic activity. *Eur.J Pharmacol.* 122, 329-338.
- Wong,E.Y. y Herbert,J. (2005). Roles of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the regulation of progenitor proliferation in the adult hippocampus. *Eur.J Neurosci* 22, 785-792.
- Wood,E.R., Mumby,D.G., Pinel,J.P., y Phillips,A.G. (1993). Impaired object recognition memory in rats following ischemia-induced damage to the hippocampus. *Behav.Neurosci.* 107, 51-62.
- Woolley,C.S., Gould,E., y McEwen,B.S. (1990). Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.* 531, 225-231.
- Wyss,J.M., Chambless,B.D., Kadish,I., y van Groen,T. (2000). Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. *Neurobiol.Aging* 21, 671-681.
- Xu,L., Anwyl,R., y Rowan,M.J. (1997). Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature* 387, 497-500.
- Xu,L., Anwyl,R., y Rowan,M.J. (1998). Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus. *Nature* 394, 891-894.
- Yau,J.L., Hibberd,C., Noble,J., y Seckl,J.R. (2002). The effect of chronic fluoxetine treatment on brain corticosteroid receptor mRNA expression and spatial memory in young and aged rats. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 106, 117-123.
- Yeckel,M.F. y Berger,T.W. (1990). Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 5832-5836.
- Yehuda,R. (2001). Are glucocorticoids responsible for putative hippocampal damage in PTSD? How and when to decide. *Hippocampus* 11, 85.
- Young,A.H., Sahakian,B.J., Robbins,T.W., y Cowen,P.J. (1999). The effects of chronic administration of hydrocortisone on cognitive function in normal male volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 145, 260-266.
- Young,E.A., Haskett,R.F., Murphy-Weinberg,V., Watson,S.J., y Akil,H. (1991). Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. *Arch.Gen.Psychiatry* 48, 693-699.

Bibliografía

- Zhao,M., Li,D., Shimazu,K., Zhou,Y.X., Lu,B., y Deng,C.X. (2007). Fibroblast Growth Factor Receptor-1 Is Required for Long-Term Potentiation, Memory Consolidation, and Neurogenesis. *Biol.Psychiatry*.
- Zohar,J., Mueller,E.A., Insel,T.R., Zohar-Kadouch,R.C., y Murphy,D.L. (1987). Serotonergic responsivity in obsessive-compulsive disorder. Comparison of patients and healthy controls. *Arch.Gen.Psychiatry* 44, 946-951.
- Zola-Morgan,S., Squire,L.R., Amaral,D.G., y Suzuki,W.A. (1989). Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. *J.Neurosci.* 9, 4355-4370.
- Zurita,A., Martijena,I., Cuadra,G., Brandao,M.L., y Molina,V. (2000). Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. *Behav.Brain Res.* 117, 163-171.